



TESIS DE DOCTORADO

**APLICACIÓN DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR AL  
ESTUDIO DE LA EPIDEMIOLOGÍA Y  
ERRADICACIÓN DE LA ENFERMEDAD  
ALEUTIANA DEL VISÓN: DETECCIÓN  
AMBIENTAL Y ESTUDIOS FILOGENÉTICOS**

**Ricardo Fernández Antonio**

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD VETERINARIA

LUGO

2021







## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

### **Aplicación de la biología molecular al estudio de la epidemiología y erradicación de la enfermedad aleutiana del visón: detección ambiental y estudios filogenéticos**

D. Ricardo Fernández Antonio

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

*En Lugo, 14 de Enero de 2021*

Fdo. Ricardo Fernández Antonio





## **AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS**

### **Aplicación de la biología molecular al estudio de la epidemiología y erradicación de la enfermedad aleutiana del visón: detección ambiental y estudios filogenéticos**

D. Gonzalo Fernández Rodríguez

D. Alberto Prieto Lago

En condición de directores

INFORMAN:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. Ricardo Fernández Antonio, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declaramos también que la presente tesis de doctorado es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Tesis monográfica con reproducción de publicaciones, en las que la participación del doctorando ha sido decisiva para su elaboración e las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

*En Lugo, 14 de Enero de 2021*

Fdo. Gonzalo Fernández Rodríguez

Fdo. Alberto Prieto Lago



## DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

El doctorando declara no tener ningún conflicto de interés en relación la presente tesis doctoral.

*En Lugo, 14 de Enero de 2021*

Fdo. Ricardo Fernández Antonio





## FINANCIACIÓN

Este trabajo se ha realizado gracias a la concesión del siguiente proyecto de investigación:

- Ayuda para consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas del Sistema Universitario de Galicia (GR2015/003). Consellería de Educación e Ordenación Universitaria. Xunta de Galicia. Investigador principal: Pablo Díez Baños.

Además del mencionado proyecto, este trabajo ha sido también posible gracias a la financiación aportada por la Asociación Gallega de Criadores de Visón (AGAVI).







## **LISTADO DE PUBLICACIONES QUE APORTAN CONTENIDOS** **A LA PRESENTE TESIS DOCTORAL**

1. Prieto, A., Díaz-Cao, J.M., **Fernández-Antonio, R.**, Panadero, R., Díaz, P., López, C., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Fernández, G. 2014. Application of real time PCR to detect Aleutian Mink Disease Virus on environmental farm sources. Vet. Microbiol. 173, 355-359.  
Editorial: Elsevier (ISSN: 0378-1135).  
Factor de impacto (2014): 2,511; Q1 en la categoría Veterinary Sciences (6/133).  
Contribución de doctorando: conceptualización del trabajo, recogida de muestras, análisis de resultados, revisión del manuscrito.
2. Prieto, A., **Fernández-Antonio, R.**, Díaz-Cao, J.M., López, G., Díaz, P., Alonso, J.M., Morrondo, P., Fernández, G., 2017. Distribution of Aleutian mink disease virus contamination in the environment of infected mink farms. Vet. Microbiol. 204, 59-63.  
Editorial: Elsevier (ISSN: 0378-1135).  
Factor de impacto (2017): 2,525; Q1 en la categoría Veterinary Sciences (8/140).  
Contribución de doctorando: conceptualización del trabajo, recogida de muestras, análisis de resultados, revisión del manuscrito.
3. Díaz-Cao, J.M., Prieto, A., López, G., **Fernández-Antonio, R.**, Díaz, P., López, C., Remesar, S., Díez-Baños, P., Fernández, G., 2018. Molecular assessment of visitor personal protective equipment contamination with the Aleutian mink disease virus and porcine circovirus-2 in mink and porcine farms. PLoS One 13(8), e02033144.  
Editorial: Public Library Science (eISSN: 1932-6203).  
Factor de impacto (2018): 2,776; Q2 en la categoría Multidisciplinary Sciences (24/69).  
Contribución de doctorando: conceptualización del trabajo, recogida de muestras, análisis de resultados, revisión del manuscrito.
4. Prieto, A., **Fernández-Antonio, R.**, López-Lorenzo, G., Díaz-Cao, J.M., López-Novo, C., Remesar, S., Panadero, R., Díaz, P., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Fernández, G., 2020. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus causing outbreaks in mink farms from Southwestern Europe: a retrospective study from 2012 to 2019. J. Vet. Sci. 21(4), e65.  
Editorial: The Korean Society of Veterinary Science (eISSN: 1976-555X).  
Factor de impacto (2019): 1,561; Q2 en la categoría Veterinary Sciences (46/141).  
Contribución de doctorando: conceptualización del trabajo, recogida de muestras, análisis de resultados, revisión del manuscrito.



A Paco Fraile, granjero, biólogo y amigo,  
que me transmitió su pasión por este  
fascinante animal que es el visón de  
granja. Con él tengo contraída una deuda  
impagable por su desinteresada acogida y  
ayuda durante toda mi andadura  
profesional en el sector.

*In memoriam.*

[63] *La belleza es orden en las partes de un todo.*

[64] *La inteligibilidad es orden entre diferentes todos.*

[72] *La inteligibilidad y la belleza comparten como mínimo una cosa: ambas tienen que ver con una ración de orden dentro del desorden.*

[90] *El mundo podría haber estado vacío de toda inteligibilidad, pero no lo está.*

[91] *El mundo podría haber estado vacío de toda belleza, pero no lo está.*

[92] *Quizá no sepamos nunca por qué el mundo es inteligible, ni por qué hay belleza en él, pero apostaría a que se trata de dos preguntas con la misma respuesta.*

**Jorge Wagensberg.** A más cómo, menos por qué. 2006



## Agradecimientos

Aquí estoy al fin, dando los últimos retoques a la tesis y redactando los agradecimientos. Lo que en la mayoría de los casos es el inicio de una carrera profesional es para mí el colofón a muchos años de trabajo como veterinario de explotaciones de visón; es probable que pocos hitos profesionales más me queden por abordar, o quizá no sea así y el futuro me depare aún nuevos desafíos. En todo caso, ahora no sólo toca redactar los agradecimientos concretos en relación con esta tesis, sino que también es un buen momento para mirar atrás y recapitular los pasos que me han llevado hasta aquí y agradecer a todos los magníficos profesionales que me han ayudado, inspirado y enriquecido con su calidad profesional y humana a lo largo este extenso periodo de ejercicio de la profesión.

Aunque el proyecto de realizar la tesis doctoral viene de lejos, dicho proyecto nunca llegó a plasmarse debido a las dificultades que conlleva aunar la investigación y el trabajo fuera de un ambiente académico. Sin embargo, la relación con la Universidad fue siempre un eje vertebrador en mi labor profesional y un apoyo imprescindible para afrontar con éxito los retos que día a día se presentan en el quehacer del veterinario de granja. Los sistemas aislados tienden a decaer, por lo que en un sector tan reducido como el de la cría de visones en España las aportaciones de compañeros especializados en otros campos resultan especialmente valiosas; lo mismo es aplicable al intercambio continuo de experiencias e información con compañeros de otros países productores. Trataré a continuación de rendir tributo a todos ellos, y pido disculpas anticipadas por imperdonables olvidos y omisiones que inevitablemente se producen en un resumen de este tipo.

En primer lugar, tengo una deuda de gratitud con **Jose María Nieto** y todo su equipo de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Lugo, y especialmente con **Maribel Quiroga** y **Mónica López**. Ellos me mostraron la importancia del diagnóstico histopatológico además de brindarme una amistad y un calor humano que llevaré siempre conmigo. Estoy igualmente en deuda con el equipo del hospital Rof Codina, especialmente con **Luciano Espino** y **Andrés Barreiro**, los cuales siempre han estado ahí, dispuestos a ayudar y a aplicar su profundo conocimiento clínico a las enfermedades del visón, especialmente en aquellas que por no estar suficientemente estudiadas requerían un esfuerzo especial al tiempo que planteaban un reto profesional gratificante; a ellos dos y a todos los miembros de su equipo que de un modo u otro participaron en estos trabajos, mi más sincera gratitud. Una mención especial merecen **Sergio Vidal Rubial**, cuyo prematuro fallecimiento truncó una brillante carrera profesional, y **Mar Yllera** por sus estudios sobre fisiología reproductiva del visón. A Mar le debo además muchas e inolvidables jornadas de disección e impagables y esclarecedoras lecciones de anatomía; he conocido a pocas personas tan enamoradas como ella de su profesión. Mi reconocimiento también a **Matilde Lombardero** por su participación en esas inolvidables sesiones de disección. Mi profundo agradecimiento a los tres.

Hay acontecimientos y personas que marcan para bien, y a veces hasta explican aspectos de una vida. De entre esos hitos singulares debo rescatar aquí algunos de los más relevantes en mi trayectoria profesional y que, como suele ocurrir, terminaron dejando también una

profunda huella personal; no están todos y pido disculpas por ello, pero los que están no podrían ser omitidos sin traicionar la memoria y la deuda de gratitud contraída. Para empezar quiero dejar aquí plasmado un cariñoso recuerdo a la figura de ese veterinario inmenso que fue **Jose Antonio Fernández Chaves**; él tuteló mis primeros pasos en el sector y fue siempre un ejemplo de bonhomía además de un veterinario multidisciplinar e innovador que a lo largo de su extensa e incansable vida profesional tocó innumerables palos. Las segundas oportunidades existen, y el papel jugado en su día por **Jean Michel** y **Emmanuel Layous** fue para mí justamente eso. Padre e hijo, con su impecable caballerosidad y elegancia, me prestaron un apoyo moral y logístico decisivo en un momento clave de mi trayectoria profesional; no puedo dejar pasar esta oportunidad para agradecerles de todo corazón lo que hicieron por mí. Igualmente tengo una deuda impagable con **Belén Barreiro**, que compartió conmigo los primeros años de la industria del visón en España y ha estado siempre dispuesta a aportar soluciones desde el campo del diagnóstico veterinario donde desde hace muchos años se desarrolla su exitosa carrera profesional; gracias por haber creído siempre en mí, por darme ánimos y mostrarme soluciones en los momentos de desaliento. No sólo has sido una fuente de inspiración y aliento profesional, también un ejemplo vital y una gran amiga. Es también el momento de rendir aquí póstumo tributo a **Jose Luis Puerta**, quien desde la Administración, donde ejerció durante años como jefe de área de inspección veterinaria de A Coruña, se preocupó de conocer y establecer puentes entre el sector y la Administración, aportando con sus conocimientos y carácter dialogante soluciones para el encuadre de nuestra actividad en la cambiante normativa europea, estatal y autonómica ¡Cuánto se te echa de menos en estos momentos tan difíciles para el sector! Estoy seguro de que no te habrías perdido la defensa de esta tesis y de que la discusión de sus resultados nos habría dado la excusa perfecta para más de una comida. Finalmente, ya en épocas recientes, dos jóvenes profesionales llenas de energía y dedicación al bienestar animal de los animales de granja, **Aida Xercavins** y **Aranzazu Varvaró**, las inspectoras del programa *Welfur* de bienestar animal en las granjas de visón, fueron un soplo de aire fresco en el sector; ha sido para mí una satisfacción haber contado con su aprecio, así como su inestimable contribución en la redacción de la sección de bienestar animal de la *Guía de Buenas Prácticas* del sector español.

Igualmente, mi trayectoria profesional se ha visto permanentemente enriquecida e inspirada por la constante interacción con el sector internacional de la cría de animales de peletería, especialmente con los veterinarios especialistas de otros países en Europa y Norte América; nuestras reuniones anuales fueron siempre un lugar de intercambio de experiencias y un estímulo profesional dentro de un entorno de camaradería y aprecio mutuo. Especial mención merecen mis dos colegas del que dimos en denominar “grupo de trabajo”, **Dean Armstrong** y **Henk Kamevaar**, agudos e inteligentes “*mink-advisers*” habitados por una irredenta alma cosmopolita e insaciable curiosidad; con ellos compartí durante muchos años experiencias del trabajo práctico en producción y nutrición de animales de peletería así como inolvidables viajes para conocer la realidad del sector en otros países, sabéis que os llevo siempre en mi corazón.

Es de ley además agradecer aquí a todo el sector de cría de animales de peletería de España la confianza que depositaron en mí durante tantos años, su abnegado trabajo, que no conoce

fin de semana ni vacaciones, y su disposición a colaborar con su tiempo y recursos en todo el trabajo de campo que sostiene esta tesis; a todo el sector en su conjunto mi más sincera gratitud y reconocimiento. Todos y cada uno de los granjeros merecen una mención porque de todos he aprendido y a todos me une de un modo u otro una relación personal; no obstante, por razones de espacio, limitaré dichas menciones a algunas personas en representación del sector en su conjunto. En primer lugar, mi agradecimiento a **Juan Varela**, que aunque no se encuentra ya entre nosotros está en la memoria de todo el sector; gracias por abrirme las puertas allá por el año 1984 y delegar en mí tanta confianza y responsabilidad. En segundo lugar, a **Isidoro Cisneros**, quien desde la fábrica de pienso y la directiva de la asociación de granjeros (AGAVI) mantuvo dicha confianza hasta el presente; sin su fe en mi persona este proyecto no habría sido posible ni habría contado con la financiación inicial que permitió su puesta en funcionamiento; de su envidiable filosofía de vida he aprendido además importantes lecciones. Citaré a continuación a tres de los granjeros en representación de todo el sector, por ser en sus granjas donde se ha desarrollado buena parte del trabajo experimental. **Paco Rumbo**, quien con su sensatez y buen criterio me ayudó en tantos aspectos prácticos del trabajo de granja, tan necesarios para el correcto desempeño como veterinario de explotaciones; además, su impagable sentido del humor, siempre presente aún en los trances más difíciles, hizo que incluso los momentos bajos resultaran llevaderos. Los hermanos **Rogelio** y **José Lois**, granjeros vocacionales, experimentados, eficaces y competentes; ellos han sufrido como nadie el azote de la enfermedad aleutiana sin perder la presencia de ánimo ni su visión siempre optimista de la realidad; ha sido para mí un honor trabajar con vosotros todos estos años. Quiero además citar de forma expresa a **Antonio Santiso**, jefe de producción de la fábrica de pienso, quien allá por finales de los 80 se inició conmigo en el sector, asistiéndome en mi trabajo en granja y en los primeros pasos del laboratorio de control de calidad; su solidez personal y su competencia profesional han sido esenciales para la buena marcha del sector además de un ejemplo de calidad humana. Finalmente, de todo corazón, mi agradecimiento a **Rocío Pérez** y a **Tania Mourriño**, mis asistentes en el trabajo de oficina en dos periodos diferentes: gracias por soportar mis malos momentos, por hacer posibles y más luminosos los buenos y por vuestra nobleza de carácter y abnegada entrega al trabajo; no sólo yo os estoy agradecido, me consta que todo el sector lo está igualmente. Sin ellas, siempre ahí, resolviendo problemas y ordenando la información, no habría dispuesto del tiempo necesario para realizar ni esta tesis ni muchas otras cosas.

Y llego ya a la historia concreta de esta tesis. Cuando en 2013 **Gonzalo Fernández** me mostró el termociclador PCR a tiempo real de su departamento y le planteé el reto de realizar detección ambiental del virus de la enfermedad aleutiana del visón no era en absoluto consciente de lo mucho que esa idea iba a dar de sí, ni de todo el tiempo que le iba a dedicar para sacarla adelante, ni de lo lejos que su excelente equipo de colaboradores iba a ser capaz de llevar la detección ambiental de patógenos de granja. Tras tantos años luchando por erradicar el AMDV de las granjas de visón, viviendo estimulantes progresos pero también frustrantes reveses, ¿cómo desaprovechar la oportunidad de *visualizar* al virus allí donde hasta ese momento sólo podía ser imaginado o inferido en base a evidencias indirectas? Nunca podré agradecerle lo bastante esa confianza que depositó en mí, ni el modo en el que él y su



excelente equipo se implicaron en el proyecto. Cuando Gonzalo me planteó la realización de la tesis me lo pensé dos veces: no estaba seguro de estar dispuesto a dedicar tanto tiempo a un proyecto de esa envergadura entrado ya en los últimos años de mi vida profesional; sin embargo, mi confianza en él me llevó a aceptar el reto sin ser del todo consciente del enorme esfuerzo que iba a suponer. Su apoyo y aliento evitaron que en los momentos de desánimo tirara la toalla. Mi más sincero agradecimiento por creer en mí, y mi admiración por tu experiencia, sensatez, amor a la profesión y enormes conocimientos de epidemiología y sanidad animal. Gonzalo ha marcado el camino a seguir y ha gestionado con generosidad y pragmatismo los recursos volcados en esta tesis. Sin embargo, nada habría sido posible sin el permanente desvelo y ayuda del codirector de la misma, **Alberto Prieto**. No sólo debo agradecerle su incansable trabajo de laboratorio con la PCR y sus desvelos para editar las secuencias genéticas y elaborar los árboles filogenéticos, ejes vertebradores de este trabajo, sino que además él ha sido el supervisor y corrector permanente de este manuscrito; de nuestras discusiones se derivan además muchas de las ideas que sustentan esta tesis. Su trabajo tuvo que costarle encauzar mi mente especulativa, acostubrada al trabajo de campo (tantas veces guiada por la experiencia previa y la intuición), a una metodología más acorde a la investigación científica. Gracias por tu dedicación, por tu capacidad de trabajo, por tu paciencia en la lectura y corrección de la tesis y en nuestras largas discusiones para la interpretación de los resultados. Mi agradecimiento también a los demás miembros del equipo INVESAGA y en especial al resto de miembros de la unidad de Enfermedades Infecciosas, **José Manuel Díaz y Gonzalo López**.

En este momento, ya casi cerrada la tesis, el esfuerzo y sacrificio empeñado en la tarea se ve con creces compensado por la sensación de “renacimiento” intelectual que implica reaprender lo que crees ya sabido, romper viejos paradigmas, incorporar ideas nuevas y enfrentar la ingente tarea de volcar todo eso en una tesis. Tanto si el sector sobrevive a la crisis sanitaria del SARS-CoV-2, para lo cual todos trabajamos con desvelo, como si los reveses del destino hubieran sentenciado ya su final, el fruto de este esfuerzo habrá merecido la pena por la satisfacción intelectual que conlleva. Albergó al mismo tiempo la esperanza de que pueda ser de utilidad a compañeros implicados en la lucha frente a otras enfermedades infecciosas y en el estudio de la epidemiología de los amnoparvovirus en la fauna silvestre.

Finalmente quiero agradecer la paciencia, comprensión y apoyo recibidos de mi hija, amigos y allegados al adaptarse a mi falta de disponibilidad durante estos dos últimos años en los que estuve inmerso en la redacción de la tesis. Espero poder ahora compensaros como merecéis por esa espera.



# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. PRODUCCIÓN DE VISIONES .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. DEFINICIÓN E HISTORIA DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.1. Definición .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.2. Importancia de la enfermedad y repercusiones económicas .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.3. Historia.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3. ETIOLOGÍA .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.1. La familia <i>Parvoviridae</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.2. El género <i>Amdoparvovirus</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.3. El virus de la enfermedad aleutiana del visón (AMDV: Aleutian Mink disease Virus).....</b>	<b>24</b>
1.3.3.1. Estructura.....	24
1.3.3.2. Diversidad del AMDV .....	27
1.3.3.3. Resistencia .....	30
<b>1.4. EPIDEMIOLOGÍA.....</b>	<b>33</b>
<b>1.4.1. Distribución mundial .....</b>	<b>33</b>
<b>1.4.2. Rango de hospedadores .....</b>	<b>34</b>
<b>1.4.3. Vías de transmisión.....</b>	<b>40</b>
1.4.3.1. Transmisión vertical .....	41
1.4.3.2. Transmisión horizontal .....	42
1.4.3.2.1. Vías de eliminación del virus, periodo infectivo y carga ambiental.....	42
1.4.3.2.2. Transmisión horizontal directa.....	44
1.4.3.2.3. Transmisión horizontal indirecta.....	45
1.4.3.2.4. La importancia de la vía horizontal .....	46
1.4.3.3. Otros factores epidemiológicos a tener en cuenta en la transmisión .....	48
1.4.3.3.1. El papel de la forma no-progresiva en la epidemiología .....	48
1.4.3.3.2. Factores de riesgo en la infección de granjas libres de la enfermedad .....	49
1.4.3.3.3. La fauna silvestre.....	49
<b>1.4.4. Epidemiología molecular .....</b>	<b>50</b>
<b>1.5. PATOGENIA, CUADRO CLÍNICO Y LESIONAL .....</b>	<b>53</b>

<b>1.5.1. La enfermedad en crías recién nacidas .....</b>	<b>53</b>
<b>1.5.2. La infección en visones adultos .....</b>	<b>54</b>
1.5.2.1. Formas de la enfermedad .....	54
1.5.2.1.1. <i>La forma progresiva.....</i>	54
1.5.2.1.2. <i>La infección persistente no progresiva.....</i>	57
1.5.2.1.3. <i>La infección no persistente/no progresiva .....</i>	57
1.5.2.2. Factores implicados en la patogenia de la enfermedad .....	57
1.5.2.2.1. <i>Síndrome de Chediak-Higashi .....</i>	57
1.5.2.2.2. <i>La hipergammaglobulinemia y la respuesta inmunitaria humoral.....</i>	58
1.5.2.2.3. <i>La formación de inmunocomplejos .....</i>	58
1.5.2.2.4. <i>Intensificación de la infección dependiente de anticuerpos.....</i>	59
1.5.2.2.5. <i>La replicación restringida .....</i>	59
1.5.2.2.6. <i>El papel de las caspasas .....</i>	60
1.5.2.2.7. <i>El papel de las citoquinas .....</i>	61
1.5.2.3. Cuadro clínico y lesional.....	61
1.5.2.3.1. <i>Cuadro clínico.....</i>	61
1.5.2.3.2. <i>Lesiones.....</i>	62
<b>1.5.3. La infección transplacentaria.....</b>	<b>63</b>
<b>1.6. DIAGNÓSTICO .....</b>	<b>65</b>
<b>1.6.1. Diagnóstico clínico y epidemiológico .....</b>	<b>65</b>
<b>1.6.2. Diagnóstico de laboratorio.....</b>	<b>65</b>
1.6.2.1. Técnicas directas .....	65
1.6.2.1.1. <i>Aislamiento del virus.....</i>	65
1.6.2.1.2. <i>Técnicas de detección de ácidos nucleicos: Hibridación in situ y PCR .....</i>	65
1.6.2.2. Técnicas indirectas .....	67
1.6.2.2.1. <i>Detección de las alteraciones en el perfil de proteínas séricas .....</i>	67
1.6.2.2.2. <i>El test CIEP.....</i>	68
1.6.2.2.3. <i>Otros test serológicos basados en electroforesis .....</i>	71
1.6.2.2.4. <i>ELISA .....</i>	71
1.6.2.3. Consideraciones a tener en cuenta en el diagnóstico de laboratorio .....	71
<b>1.7. TRATAMIENTO, PREVENCIÓN, CONTROL Y ERRADICACIÓN .....</b>	<b>73</b>
<b>1.7.1. Tratamiento y profilaxis vacunal.....</b>	<b>73</b>
1.7.1.1. Modulación inmunológica .....	73

1.7.1.2. Vacunación .....	73
<b>1.7.2. Prevención, control y erradicación.....</b>	<b>74</b>
1.7.2.1. Prevención .....	75
1.7.2.2. Estrategias enfocadas a la erradicación.....	76
1.7.2.2.1. Ejemplos de estrategias en diferentes países.....	80
1.7.2.2.2. Limitaciones actuales de los programas de erradicación .....	85
1.7.2.3. Estrategias enfocadas al control de la enfermedad .....	86
<b>1.8. DETECCIÓN AMBIENTAL.....</b>	<b>89</b>
<b>1.8.1. Objetivos de la detección ambiental .....</b>	<b>89</b>
<b>1.8.2. Limitaciones.....</b>	<b>91</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>95</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>99</b>
<b>3.1. TOMA DE MUESTRAS .....</b>	<b>101</b>
3.1.1. Muestras ambientales .....	101
3.1.2. Muestras biológicas.....	102
<b>3.2. PROCESADO DE MUESTRAS.....</b>	<b>103</b>
3.2.1. Preparación de muestras ambientales.....	103
3.2.2. Extracción y purificación del ADN.....	103
3.2.2.1. Protocola A (NucleoSpin® Soil) .....	103
3.2.2.2. Protocolo B (High Pure PCR Template Kit).....	104
<b>3.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....</b>	<b>105</b>
3.3.1. Técnica de qPCR.....	105
3.3.1.1. Protocolo de la técnica.....	105
3.3.1.2. Interpretación de resultados .....	106
3.3.1.3. Cuantificación.....	108
3.3.2. Amplificación y secuenciación parcial de las dianas moleculares NS1 y VP2 .....	108
3.3.2.1. Protocolo de las técnicas de PCR convencional para la amplificación parcial de las dianas NS1 y VP2.....	109
3.3.2.2. Visualización de los productos amplificados.....	109
3.3.2.3. Secuenciación y procesamiento de secuencias .....	111

3.4. ESTUDIO 1: APLICACIÓN DEL QPCR PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN EN MUESTRAS AMBIENTALES DE GRANJA .....	112
3.5. ESTUDIO 2: DISTRIBUCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN EN EL AMBIENTE DE GRANJAS INFECTADAS.....	115
3.6. ESTUDIO 3: EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE LOS EQUIPOS DE PROTECCIÓN INDIVIDUAL (EPI) POR EL AMDV.....	117
3.7. ESTUDIO 4: EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN EN EL SUROESTE DE EUROPA: ESTUDIO RETROSPECTIVO DEL PERIODO 2012-2020.....	120
 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	 125
4.1. ESTUDIO 1: APLICACIÓN DEL QPCR PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN EN MUESTRAS AMBIENTALES DE GRANJA .....	127
4.2. ESTUDIO 2: DISTRIBUCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN EN EL AMBIENTE DE GRANJAS INFECTADAS.....	133
4.3. ESTUDIO 3: EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE LOS EQUIPOS DE PROTECCIÓN INDIVIDUAL (EPI) POR EL AMDV.....	140
4.4. ESTUDIO 4: EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN EN EL SUROESTE DE EUROPA: ESTUDIO RETROSPECTIVO DEL PERIODO 2012-2020.....	148
 5. CONCLUSIONES .....	 183
 6. RESUMEN – RESUMO – ABSTRACT .....	 187
 7. BIBLIOGRAFÍA .....	 209
 ANEXOS .....	 239

## **Abreviaturas**

A:GG: Cociente Albúmina:Globulinas  
AAV5: Adeno-Associated Virus 5  
AD: Aleutian Disease  
ADE: Antibody Dependent Enhancement of Infection. Intensificación de la infección dependiente de anticuerpos  
ADNmc: ADN monocatenario  
ADN: Ácido Desoxiribonucleico  
ADSG: agrupación de defensa sanitaria ganadera  
AGAVI: Asociación Gallega de Criadores de Visonos  
AIC: Akaike Information Criterion  
AMDV: Aleutian Mink Disease Virus. Virus de la Enfermedad Aleutiana del Visón  
ANOVA: ANalysis Of VAriance (Análisis de la varianza)  
APPCC: Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control  
ARN: Ácido Ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
B19V: Human parvovirus B1  
BALT: Bronchus Associated Lymphoid Tissue. Tejido Linfóide Asociado a los Bronquios  
BmDV1: Bombyx mori densovirus 1  
bp: base pairs. Pares de bases  
BPV1: Bovine parvovirus 1  
BPV2: Bovine parvovirus 2  
CCLAIE: Counter-Current Line Absorption Immunoelectrophoresis. Inmunoelectroforesis en Línea de Absorción  
CE: Comunidad Europea  
CIEP: Counter Immunoelectrophoresis. Contraimmunoelectroforesis  
CIP: Control interno positivo  
CPE: Control positivo externo  
CPV: Canine parvovirus.  
CPV2: Canine parvovirus 2  
CRFK: Crandell Feline Kidney Cells  
Ct: Cycle threshold. Ciclo umbral  
DI<sub>50</sub>: Dosis Infecciosa 50  
DL<sub>50</sub>: Dosis Letal 50  
dNTPs: dinucleótidos trifosfato  
dpi: días post infección  
EG: Equivalentes genómicos  
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas  
EPI: Equipo de protección individual  
Fc: Fracción/región cristizable del anticuerpo  
FEUGA: Fundación Empresa Universidad Gallega  
FPV: Feline parvovirus.  
GFAV: Gray fox amdoparvovirus  
GG: Gammaglobulinas  
GTR: General Time-Reversible  
GTR+G: General Time-Reversible con tasa de sustitución basada en distribución gamma  
HGG: Hipergammaglobulinemia  
IAT: Iodine Agglutination Test. Test de yodo  
IC: Inmunocomplejo  
ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. Comité Internacional para la taxonomía de virus

IFN- $\gamma$ : Interferón gamma  
 IgA: Inmunoglobulinas A  
 IgG: Inmunoglobulinas G  
 IgM: Inmunoglobulinas M  
 IL-6: Interleucina 6  
 IP: intraperitoneal  
 IV: intravenoso  
 kb: Kilo bases  
 LAMP: Loop-mediated isothermal Amplification. Amplificación isotérmica mediada por bucle  
 LNM: Linfonodo mesentérico  
 log10: Logaritmo decimal  
 LYST: Lysosomal trafficking regulator. Regulador del tráfico lisosomal  
 MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight. Desorción/ionización láser asistida por matriz-acoplada a un detector de iones  
 MEV: Mink Enteritis Virus  
 mpi: meses post infección  
 MVM: Minute Virus of Mice  
 N/D: No detectado  
 n: número de muestras  
 NaOH: Hidróxido sódico  
 NGS: Next generation sequencing / Secuenciación de próxima generación  
 NS1: gen/proteína no estructural NS1  
 NS2: gen/proteína no estructural NS2  
 NS3: gen/proteína no estructural NS3  
 nt: nucleótido  
 ORF: Open Reading Frames. Franjas de lectura abierta  
 pb: pares de bases  
 PBS: phosphate buffered saline. Tampón fosfato salino  
 PBT: PBS con 0.05% de Tween20  
 PCR: Polimerasa Chain Reaction. Reacción en cadena de la polimerasa  
 pi: postinfección  
 PMA: Propidium Mono Azide. Monoazida de propilo  
 Poly I-C: Ácido poliinosínico-policitidílico  
 PPV: Porcine Parvovirus  
 PRRSV: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino  
 PV: Proteína Viral.  
 qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real  
 R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación  
 RFAV: Raccoon dog and fox amdoparvovirus  
 RH: Región Hipervariable  
 RpAPV: Red panda amdoparvovirus  
 SANDACH: Subproductos Animales No Destinados A Consumo Humano  
 SCH: Síndrome de Chediak-Higashi  
 Se: Sensibilidad  
 SKAV: Skunk amdoparvovirus  
 Sp: Especificidad  
 spi: semanas post infección  
 TAE: Tris-Acetato-EDTA  
 Taq: *Thermophilus aquaticus*  
 UV: Ultravioleta  
 VP1: Gen/proteína estructural VP1  
 VP2: Gen/proteína estructural VP2

## Índice de tablas

Tabla 1. Especies de los géneros <i>Mustela</i> y <i>Neovison</i> (adaptado de Abramov, 1999) .....	4
Tabla 2. Distribución de granjas y cabaña reproductora en España (2018) (ADSG-AGAVI y datos propios no publicados).....	7
Tabla 3. Mortalidad de crías según momento del ciclo productivo (Joergensen, 1985) .....	10
Tabla 4. Parvovirus: subfamilias y géneros (adaptado de ICTV, 2018) .....	20
Tabla 5. Manifestaciones de las enfermedades por parvovirus en animales (adaptado de (Parrish, 2016).....	21
Tabla 6. Especies del género <i>Amdoparvovirus</i> (adaptado de ICTV, 2018a).....	24
Tabla 7. Descripción de las principales cepas de AMDV usadas con fines diagnósticos o de investigación (adaptada de Knuuttila, 2105) .....	29
Tabla 8. Prevalencia de la enfermedad aleutiana en granjas de visón en diferentes países (porcentaje de positivos sobre el total de muestras analizadas, si no se especifica otra cosa) .....	34
Tabla 9. Prevalencia y descripción de la infección natural por el AMDV en diferentes especies animales y seres humanos (adaptado de Knuuttila, 2105).....	37
Tabla 10. Resumen de las diferencias entre la replicación del AMDV y el papel de los anticuerpos tras la infección del visón a diferentes edades (adaptado de Best y Bloom, 2006) .....	59
Tabla 11. Evolución de la prevalencia en la zona negativa de una granja con programa de “test y sacrificio” con dos calendarios de testaje diferentes: junio y octubre vs diciembre-febrero-junio.....	83
Tabla 12. Sistema de calificación de granjas de la ADSG-AGAVI.....	85
Tabla 13. Tipos de muestras recogidas y método de recogida para cada uno de ellos.....	102
Tabla 14. Componentes de la <i>mastermix</i> utilizados en la reacción qPCR para cada muestra individual.....	105
Tabla 15. Número de copias de ADN por cada dilución del Control Positivo Externo (CPE) .....	106
Tabla 16. Protocolo térmico para la amplificación del ADN en la reacción qPCR .....	106
Tabla 17. Combinación de los posibles resultados obtenidos en la qPCR.....	108
Tabla 18. Protocolo térmico empleado para la amplificación parcial de los genes NS1 y VP2 (Leiman <i>et al.</i> , 2015).....	109
Tabla 19. Clasificación y antecedentes previos de las granjas incluidas en el estudio 1 .....	113
Tabla 20. Tipo y número de muestras ambientales recogidas en cada una de las granjas incluidas en el estudio 1 .....	113
Tabla 21. Tipo y número de muestras incluidas en cada categoría.....	115
Tabla 22. Resumen del nº muestras recogidas de cada tipo en cada uno de los ensayos (2015 y 2017) .....	119
Tabla 23. Clasificación y características de las muestras seleccionadas para este estudio .....	121



Tabla 24. Resultados obtenidos por PCR de las muestras ambientales tomadas de granjas con riesgo de infección y con infección confirmada por el AMDV. Los resultados de recuento se expresan como la media del nº de equivalentes genómicos/hisopo para cada tipo de muestra.....	128
Tabla 25. Resultados de cuantificación del virus de la enfermedad aleutiana del visón en cada categoría de muestras por los métodos de extracción A y B. Valores expresados en nº de equivalentes genómicos/hisopo .....	134
Tabla 26. Resumen de los resultados de las muestras recogidas en los ensayos de 2015 y 2017 para los grupos de EPI certificados y no certificados, mostrando nº de positivos sobre el total de muestras, media y rango del nº de equivalentes genómicos/hisopo según tipo de muestra .....	141
Tabla 27. Resumen de los resultados de las muestras recogidas de jaulas, suelos y zona de parking en los ensayos de 2015 y 2017, mostrando nº de positivos sobre el total de muestras, media y rango del nº de equivalentes genómicos/hisopo según tipo de muestra.....	142
Tabla 28. Porcentajes de homología para todas las secuencias obtenidas en este estudio para la diana molecular de NS1 (color verde pálido, parte inferior de la tabla) y VP2 (color verde oliva, parte superior de la tabla). Las secuencias se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra_Año de recogida” .....	149
Tabla 29. Porcentajes de homología para la diana molecular NS1 entre las secuencias del subclado Ia de este estudio (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo I).....	161
Tabla 30. Porcentajes de homología para la diana molecular NS1 entre las secuencias de los subclados Ib y Ic de este estudio (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo I).....	162
Tabla 31. Porcentajes de homología para la diana molecular NS1 entre las secuencias del clado II de este estudio (subclados IIa y IIb) (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo I) .....	165
Tabla 32. Porcentajes de homología para la diana molecular NS1 entre las secuencias del clado III de este estudio (subclados IIIa y IIIb) (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo I) .....	165
Tabla 33. Porcentajes de homología para la diana molecular VP2 entre las secuencias del clado I de este estudio (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de	



muestra_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo II) .....	168
Tabla 34. Porcentajes de homología para la diana molecular VP2 entre las secuencias del clado IV de este estudio (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo II) .....	168
Tabla 35. Porcentajes de homología para la diana molecular VP2 entre las secuencias del clado II y III de este estudio (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo II) .....	170
Tabla 36. Clasificación de las granjas incluidas en el estudio según los clados y subclados obtenidos a partir del árbol filogenético de fragmentos concatenados NS1+VP2, junto con diferentes datos epidemiológicos para cada clado/subclado .....	172





## Índice de figuras

Figura 1. Estructura del pelaje del visón: pelo de borra o felpa cubierto por la púa.....	5
Figura 2. Variedades de color no aleutianas en visón de granja: A) Dark americano, B) Wild-Type, C) Mahogani, D) Pastel, E) Black Jaguar, F) Brown Jaguar, G) Marble, H) Blanco Hedlund, I) Silver-Blue, J) Palomino Cross, K) Black-Cross, L) Palomino.....	6
Figura 3. Variedades azules (aleutianas): A) Blue-Iris, B) Sapphire, C) Violet, D) Violet-Cross, E) macho Sapphire x hembra Silver.....	7
Figura 4. Características estructurales y de diseño de una granja de visones: A) Exterior de una granja con naves de un solo pasillo y cierre perimetral; B) interior de una nave de pasillos múltiples, mostrando cerchas, nidos y jaulas; C) jaula de dos niveles, con bandeja de descanso en el nivel superior; D) interior de un nido, mostrando la abertura de comunicación con la jaula y paja como material de cama.....	8
Figura 5. Esquema del ciclo anual en las granjas de visón en España .....	12
Figura 6. Árbol filogenético de la subfamilia <i>Parvovirinae</i> basado en la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 (adaptado de ICTV, 2018b, con licencia CC BY-SA 4.0) .....	23
Figura 7. Representaciones de los parvovirus AMDV-G <sub>VP2</sub> (A), CPV (B) y B19 (C) centradas sobre un eje de simetría 2 (resolución de 22, 21 y 26 Å respectivamente). Se indican las ubicaciones de algunos de los ejes icosaédricos de simetría 2, 3 y 5 (adaptado de McKenna <i>et al.</i> , 1999, con permiso de American Society for Microbiology) .....	25
Figura 8. El genoma heterotelomérico de AMDV se muestra como una línea única que termina en estructuras de horquilla enmarcadas en cajas. Los principales marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican proteínas se muestran como cuadros con flechas, algunos de los cuales están vinculados mediante empalme para crear proteínas auxiliares. Las regiones de ORF1 sombreadas en rojo codifican toda la proteína iniciadora de la replicación NS1 y contribuyen con el primer y el tercer intrón de NS2 y NS3. Las secciones de ORF3 sombreadas en verde codifican las proteínas de la cápside, VP, mientras que las secciones exclusivas de la proteína auxiliar NS2 son azules. Las regiones de ORF2 únicas para NS3 son amarillas. Las flechas sólidas representan promotores transcripcionales; AAAAA indica sitios de poliadenilación (adaptado de ICTV, 2018b, con licencia CC BY-SA 4.0).....	26
Figura 9. Patrón de externalización de ADN de diferentes parvovirus en respuesta al aumento de la temperatura durante 3 minutos. La cantidad de ADN externalizado se cuantificó mediante hibridación-extensión. Los porcentajes del ADN vírico van referidos a la cantidad total detectada después del tratamiento a 85°C (10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> moléculas/μl para todos los virus). (■) B19V; (●) Bovine parvovirus;(◆) Canine parvovirus; (▲) H1 parvovirus; (x) MVM; ( * ) Porcine parvovirus (adaptado de Mani <i>et al.</i> , 2007, con permiso de John Wiley and Sons).....	31
Figura 10. Representación esquemática de las transiciones estructurales de la cápside del parvovirus B19 durante la inactivación. La primera reorganización estructural tras el tratamiento con calor moderado o pH bajo es la externalización de las secuencias N-VP1 y la accesibilidad del ADN viral. A temperaturas más altas o condiciones más ácidas, el ADN se	

disocia de la cápside. Finalmente, la partícula viral se desintegra (adaptado de Mani *et al.*, 2007, con permiso de John Wiley and Sons)..... 31

Figura 11. Excreción de AMDV tras la infección experimental. A) heces y B) saliva. Barras negras: visión wild, infección experimental. Barras grises: visión zafiro (aa), animales centinela (adaptado de Jensen *et al.*, 2014, con permiso de Elsevier)..... 43

Figura 12. Análisis de las regiones completas de codificación del AMDV. (A) Árbol filogenético construido con la secuencia completa de la proteína NS1. El resultado del análisis bootstrap se muestra al lado de los nodos y las longitudes de las ramas son proporcionales a las distancias genéticas como lo indica la barra de escala. (B) Idem al anterior pero basado en la secuencia completa de la proteína VP2. (C) Tabla de identidades calculadas dentro y entre los grupos considerando las secuencias de proteínas NS1 y VP2. Los valores indican el rango de identidad entre pares de secuencias y se expresan como porcentajes. Los clados corresponden a los indicados en los árboles mostrados en los paneles A y B. AMDV-: diferentes cepas del *Carnivore amdoparvovirus 1*; RFAV-: *Carnivore amdoparvovirus 3*; GFAV: *Carnivore amdoparvovirus 2* (adaptado de Canuti *et al.*, 2016, con permiso de Oxford University Press)..... 52

Figura 13. Detección de AMDV en sangre (A) y desarrollo de anticuerpos frente al AMDV (B) tras la infección experimental. Barras negras: visión wild, infección experimental. Barras grises: visión zafiro (aa), animales centinela (adaptado de Jensen *et al.*, 2014, con permiso de Elsevier)..... 56

Figura 14. a) Test CIEP. Extracción de sangre de una uña (tubos capilares). b) Depósito del plasma en los pocillos del gel tras la centrifugación; cada pocillo con plasma está enfrenteado a otro con antígeno; los pocillos del antígeno se alinean del lado del cátodo y los sueros a testar del lado del ánodo. c) Electroforesis a contracorriente; el antígeno, cargado negativamente, se moverá en dirección al ánodo y los anticuerpos, cargados positivamente, se moverán en dirección opuesta. d) La reacción positiva se lee como una línea de precipitado situada entre ambos pocillos..... 69

Figura 15. Esquema del sistema de erradicación en granjas danesas hacia 1984 (Hansen, 1985)..... 81

Figura 16. Material empleado y proceso de recogida de muestras ambientales: A) Tubos estériles de polipropileno de 12 ml e hisopos estériles de algodón de 11 mm de diámetro; B) Toma de muestra ambiental sobre la pared de una jaula; C) Introducción del hisopo en el tubo estéril; D) Muestra ambiental a su llegada al laboratorio..... 101

Figura 17. Esquema de los componentes e interpretación de los ciclos umbrales de la PCR a tiempo real. Se representan con diferentes letras (A, B, C, D) las curvas obtenidas para muestras con diferente concentración del ADN diana ..... 107

Figura 18. Foto de un gel de agarosa tras electroforesis de productos de PCR. De izquierda a derecha: ladder, muestras positivas para el fragmento NS1 (N.1 y N.2), control negativo para NS1 (C.N.), muestras positivas para el fragmento VP2 (V.1 y V.2), control negativo para VP2 (C.N.)..... 110

Figura 19. Imagen del software informático ChromasPro 2.1.4 con el que se realizó la corrección manual y el ensamblado de los cromatogramas obtenidos para cada muestra.

Pueden verse los dos cromatogramas (N1_NR arriba y N1_NF abajo) obtenidos para el fragmento NS1 de una de las muestras de esta tesis .....	111
Figura 20. Esquema de la indumentaria vestida por cada miembro de los dos equipos de este estudio: A) Modelo del grupo con EPI certificados (Grupo C); B) Modelo del grupo con EPI simples no certificados (Grupo S).....	118
Figura 21. Curva estandar obtenida mediante qPCR a partir de los patrones de AMDV con concentración conocida.....	127
Figura 22. Diagrama de cajas representando la distribución del ADN del virus de la enfermedad aleutiana del vison obtenido con los métodos de extracción A y B en cada categoría de muestras .....	137
Figura 23. Árbol filogenético bayesiano construido en base al fragmento del gen NS1 de las cepas de este estudio. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Cada secuencia se denomina con el siguiente código: “Nº de granja.Nº de muestra_Año de recogida”. Los diferentes clados se muestran con colores diferentes (Clado I = rojo; Clado II = verde; Clado III = azul. La secuencia del Gray Fox amdovirus (nº de acceso de GenBank JN202450.1) se añadió con el fin de enraizar el árbol y poder inferir posibles relaciones ancestrales. La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio.....	153
Figura 24. Árbol filogenético bayesiano construido en base al fragmento del gen VP2 de las cepas de este estudio. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Cada secuencia se denomina con el siguiente código: “Nº de granja.Nº de muestra_Año de recogida”. Los diferentes clados se muestran con colores diferentes (Clado I = rojo; Clado II = verde; Clado III = azul; Clado IV = naranja). La secuencia del Gray Fox amdovirus (nº de acceso de GenBank JN202450.1) se añadió con el fin de enraizar el árbol y poder inferir posibles relaciones ancestrales. La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio.....	154
Figura 25. Árbol filogenético bayesiano construido en base al análisis concatenado de los fragmentos NS1 y VP2 de las cepas de este estudio. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Cada secuencia se denomina con el siguiente código: “Nº de granja.Nº de muestra_Año de recogida”. Los diferentes clados se muestran con colores diferentes (Clado I = rojo; Clado II = verde; Clado III = azul; Clado IV = naranja). La secuencia del Gray Fox amdovirus (nº de acceso de GenBank JN202450.1) se añadió con el fin de enraizar el árbol y poder inferir posibles relaciones ancestrales. La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio .....	155
Figura 26. Distribución de las granjas de este estudio (Rojo, clado I; verde, clado II; azul, clado III; amarillo, clado IV). A) Mapa de la península Ibérica con las zonas adyacentes de Francia y Portugal; B) Zona noroeste de Galicia (zonas próximas a A Coruña y Santiago de Compostela); C) Zona sur de Galicia y norte de Portugal .....	156
Figura 27. Representación esquemática del árbol filogenético bayesiano construido para la diana NS1 empleando las secuencias obtenidas en este estudio y 254 secuencias previamente descritas en GenBank (Anexo I), donde se muestra la situación de los clados y subclados españoles establecidos en este estudio. Las letras mayúsculas junto a los nodos (A, B, C, D) se corresponden con las ampliaciones de las ramas en detalle que se muestran en las figuras	

28, 29, 30 y 31 respectivamente. La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio ..... 158

Figura 28. Fragmento del árbol filogenético bayesiano construido para la diana NS1 que representa una ampliación de la rama A identificada en la figura 27. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas obtenidas de GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo I). La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio ..... 159

Figura 29. Fragmento del árbol filogenético bayesiano construido para la diana NS1 que representa una ampliación de la rama B identificada en la figura 27. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas obtenidas de GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo I). La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio ..... 160

Figura 30. Fragmento del árbol filogenético bayesiano construido para la diana NS1 que representa una ampliación de la rama C identificada en la figura 27. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Las secuencias previamente descritas obtenidas de GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo I). La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio..... 163

Figura 31. Fragmento del árbol filogenético bayesiano construido para la diana NS1 que representa una ampliación de la rama D identificada en la figura 27. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas obtenidas de GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo I). La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio ..... 164

Figura 32. Representación esquemática del árbol filogenético bayesiano construido para la diana VP2 empleando las secuencias obtenidas en este estudio y 77 secuencias previamente descritas en GenBank (Anexo II), donde se muestra la situación de los clados y subclados españoles establecidos en este estudio. Las letras mayúsculas junto a los nodos (A, B) se corresponden con las ampliaciones de las ramas en detalle que se muestran en las figuras 33 y 34 respectivamente. La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio ..... 166

Figura 33. Fragmento del árbol filogenético bayesiano construido para la diana VP2 que representa una ampliación de la rama A identificada en la figura 32. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas obtenidas de GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo II). La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio ..... 167

Figura 34. Fragmento del árbol filogenético bayesiano construido para la diana VP2 que representa una ampliación de la rama B identificada en la figura 32. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas obtenidas de GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo II). La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio .....169







**CAPÍTULO 1**

**INTRODUCCIÓN**





## 1.1. PRODUCCIÓN DE VISIONES

**El visón de granja** o visón americano (*Neovison vison*, anteriormente *Mustela vison*) – en adelante, visón – es un pequeño mamífero originario de Norte América perteneciente a la familia *Mustelidae*, subfamilia *Mustelinae*. Hasta hace pocos años el visón se englobaba dentro del género *Mustela*; sin embargo, trabajos rusos y japoneses basados en el estudio anatómico y del ADN mitocondrial lo han situado dentro de un género diferente (*Neovison*), más relacionado con la comadreja de espalda rayada del sudeste de Asia (*Mustela strigidorsa*) que con el visón europeo (*Mustela lutreola*), estando más estrechamente relacionado este último con el grupo de los hurones (*Mustela furo*, *Mustela putorius* y *Mustela eversmanni*) (Abramov, 1999; revisado por Lohi *et al.*, 2015). En la tabla 1 se resumen las especies de los géneros *Mustela* y *Neovison*. Otros taxones de la familia *Mustelidae* son los géneros **Martes** (familia *Mustelidae*, subfamilia *Mustelinae*), en el que se encuadran la garduña (*Martes foina*) y la marta (*Martes martes*), y **Lutra** (familia *Mustelidae*, subfamilia *Lutrinae*) en el que se encuadra la nutria común (*Lutra lutra*). Esta familia está estrechamente relacionada con la familia *Procyonidae* (mapaches), así como con las mofetas (*Mephitidae*) y pandas rojos (*Ailuridae*), todos ellos pertenecientes a la superfamilia *Musteloidea* (Canuti *et al.*, 2020). Muchas de estas especies han sido históricamente muy apreciadas por su piel, pero es el visón la especie que ha sido, y todavía es, la de mayor importancia en la producción de animales peleteros. **El visón es una de las especies más recientemente domesticadas**; las primeras granjas de las que se tienen referencia datan de 1866 al norte del estado de Nueva York en Estados Unidos (Joergensen, 1985; FurCommission, 2011) y el área de Richmond Hill en Canadá (Morodd *et al.*, 1988). El progreso de la cría en cautividad se extendió con rapidez en Norteamérica, donde se estima que había varios cientos de granjas a principios del siglo pasado (Morodd *et al.*, 1988).

Las tres subespecies de visón que han contribuido en mayor medida al pool genético del visón de granja actual fueron: *Mustela vison vison*, Schreber (Quebec, este de Labrador y Nueva Escocia), *Mustela vison ingens*, Osgood (Alaska) y *Mustela vison melampeplus*, Elliot (península de Kenai, Alaska) (Shackelford, 1950; Morodd *et al.*, 1988; FurCommission, 2011). Además de éstas, han contribuido también aunque en menor medida las subespecies *Mustela vison mink*, Peale y *Beaubeis* (visón común), *Mustela vison lacustris*, Preble (Hudson Bay) y *Mustela vison enerquemenos*, Bangs (visón del Pacífico) (revisado por Knuuttila, 2015). Hoy en día no es posible diferenciar dichas subespecies originales en el visón de granja actual, por lo que éste se considera descendiente de una única especie, *Neovison vison*, y se le denomina comúnmente como visón doméstico o de granja (Morodd *et al.*, 1988; FurCommission, 2011). Hay que mencionar que el visón de granja en estado silvestre existe en todos los países productores debido a escapes accidentales de las granjas peleteras y a sueltas deliberadas (Knuuttila, 2015).

Tabla 1. Especies de los géneros *Mustela* y *Neovison* (adaptado de Abramov, 1999).

Género	Subgénero	Especie	Nombre común	Nombre en inglés
<b>Mustela</b>	<i>Mustela</i>	<i>Mustela erminea</i>	Armiño	Stoat
		<i>Mustela frenata</i>	Comadreja de cola larga	Long-tailed weasel
	<i>Gale</i>	<i>Mustela nivalis</i>	Comadreja común (o c. menor)	Least weasel
		<i>Mustela subpalmata</i>	Comadreja egipcia	Egyptian weasel
		<i>Mustela altaica</i>	Comadreja alpina	Mountain weasel
		<i>Mustela kathiah</i>	Comadreja de vientre amarillo	Yellow-bellied weasel
	<i>Putorius</i>	<i>Mustela putorius/M. furo</i>	Turón europeo/Hurón	European polecat/Ferret
		<i>Mustela eversmanni</i>	Turón de la estepa	Steppe polecat
		<i>Mustela nigripes</i>	Hurón de pies negros	Black-footed ferret
	<i>Lutreola</i>	<i>Mustela lutreola</i>	Visón europeo	European mink
	<i>Kolonokus</i>	<i>Mustela sibirica</i>	Comadreja siberiana	Siberian weasel
		<i>Mustela lutreolina</i>	Comadreja de Java	Indonesian mountain weasel
		<i>Mustela itatsi</i>	Comadreja japonesa	Japanese weasel
	<i>Pocockictis</i>	<i>Mustela nudipes</i>	Comadreja malaya	Malayan weasel
	<i>Grammogale</i>	<i>Mustela africana</i>	Comadreja amazónica	Amazon weasel
	<i>Cabreraagale</i>	<i>Mustela felipei</i>	Comadreja colombiana	Colombian weasel
	<i>Cryptomustela</i>	<i>Mustela strigidorsa</i>	Comadreja de espalda rayada	Back-striped weasel
<b>Neovison</b>		<i>Neovison vison</i>	Visón americano	American mink
		<i>Neovison macrodon</i> <sup>1</sup>	Visón marino	Sea mink

1. Costa este de Norte América. Recientemente extinguido

**El pelaje** del visón está constituido por dos tipos de pelo diferentes: la púa o pelo de guarda, y la borra o felpa (figura 1). Este último es un tipo de pelo homogéneo, más fino, corto y abundante que el primero y con menor cantidad de pigmento; la púa, sin embargo, puede clasificarse en tres tipos diferentes en función de su longitud (larga, media y corta). El color del pelo se debe a los gránulos de melanina embebidos en el córtex y médula del pelo, mientras que su brillo o lustre se debe a la disposición de las células cuticulares. Al igual que en otros animales peleteros, el pelo emerge de la epidermis en haces a través de un poro compartido con una glándula sebácea. En cada uno de esos haces hay un pelo de guarda y los demás son pelos de borra, presentando un total de 7-15 pelos en el pelaje de verano y 17-20 en el de invierno. El ciclo de crecimiento del pelo es estacional, mudando dos veces a lo largo del año; en la muda de primavera, el pelo es reemplazado en dirección craneocaudal, mientras que en la de otoño ocurre en dirección opuesta. El factor determinante en la muda es el fotoperiodo, en un proceso que involucra a la glándula pineal y la secreción de la hormona melatonina (Joergensen, 1985; Onderka, 1996). Al igual que en el resto de los mamíferos, la coloración del pelo depende del tipo de melanina (eumelanina y feomelanina), así como el número, tamaño, forma y disposición de los gránulos de dicho pigmento. El visón de granja

que presenta el color propio de su origen se denomina visón Standard-Black o Wild-Type (dependiendo de si la coloración tiende más al negro o al marrón) y constituyen un genotipo único y homocigótico para todos los genes de color conocidos, mientras que los colores nuevos, que han ido surgiendo a partir de mutaciones, se denominan según su fase de color en particular (Blanco, Perla, Palomino, Pastel, Violeta) (FurCommission, 2011). El primer color mutante conocido en visón fue el Silver-Blue, en 1931 (Shackelford, 1950; Morodd *et al.*, 1988). La herencia del color de pelo en el visón sigue un patrón genético fundamentalmente cualitativo y se conocen no menos de 21 genes implicados, algunos de ellos con hasta cinco formas alélicas diferentes (Morodd *et al.*, 1988). Aunque se enumeran 115 combinaciones genéticas posibles que modifican el color (Joergensen, 1985), el número de variedades que se explotan en la actualidad es mucho menor, abarcando no obstante una extensa gama de colores, algunas de las cuales pueden verse en las figuras 2 y 3. La mayor parte de ellos provienen de mutaciones recesivas de uno o varios genes, pero también se da el caso de mutaciones dominantes y de dominancia parcial, como en el Black-Cross (Ss). La pleiotropía puede observarse en algunos genes asociados al color, como es el caso de visón Aleutiano (aa), cuyo genotipo va asociado al color gris azulado oscuro y también a efectos desfavorables en la talla, resistencia a las enfermedades y viabilidad; otro caso es el de visón Blanco Hedlund (hh), de color blanco, que va asociado a sordera. La mayoría de las mutaciones dominantes o bien son letales en homocigosis o bien causan un descenso de la fertilidad u otros defectos indeseables; de manera similar, la mayoría de las mutaciones recesivas en su inicio daban lugar a animales de menor talla y fertilidad, si bien la selección fue eliminando parcialmente tales problemas. (Joergensen, 1985).

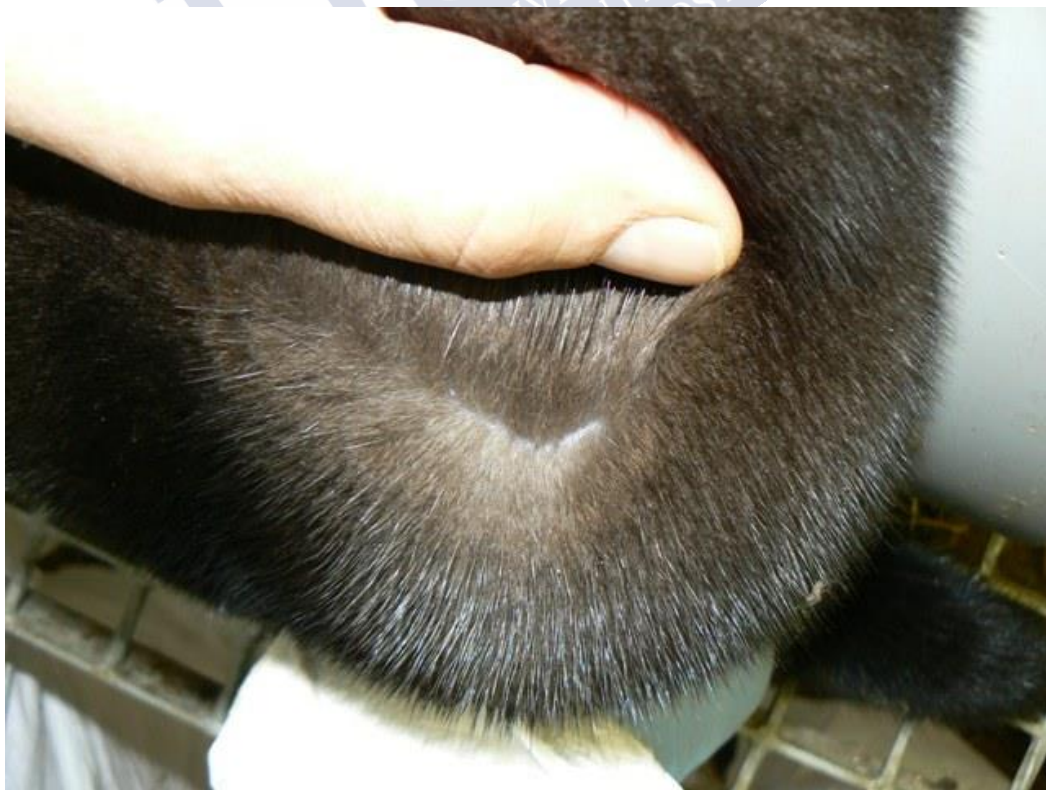


Figura 1. Estructura del pelaje del visón: pelo de borra o felpa cubierto por la púa.





Figura 2. Variedades de color no aleutianas en visión de granja: A) Dark americano, B) Wild-Type, C) Mahogani, D) Pastel, E) Black Jaguar, F) Brown Jaguar, G) Marble, H) Blanco Hedlund, I) Silver-Blue, J) Palomino Cross, K) Black-Cross, L) Palomino.



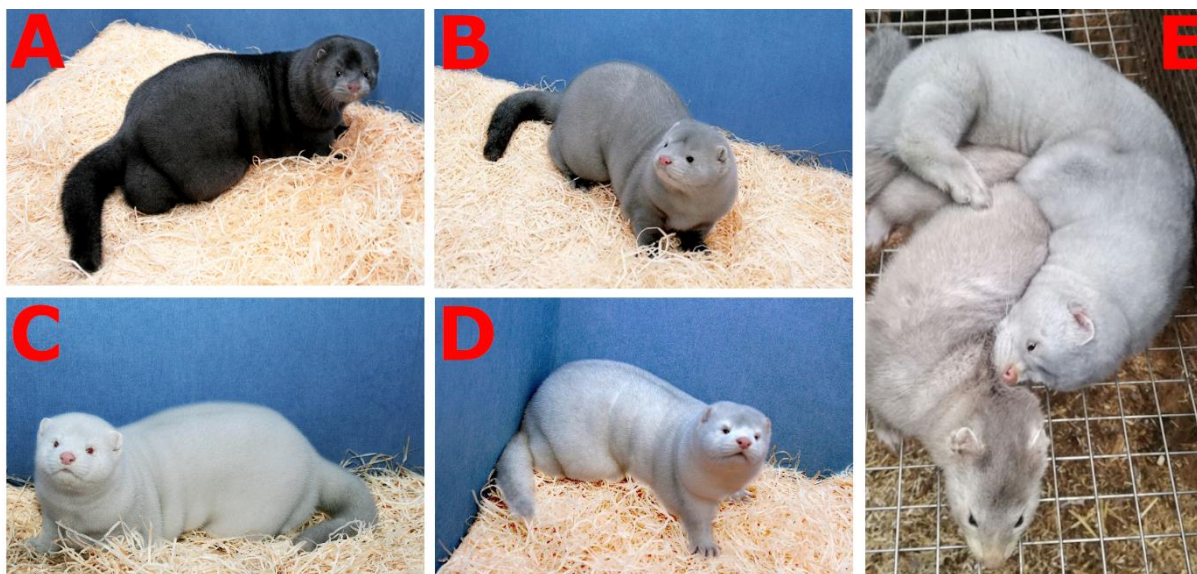


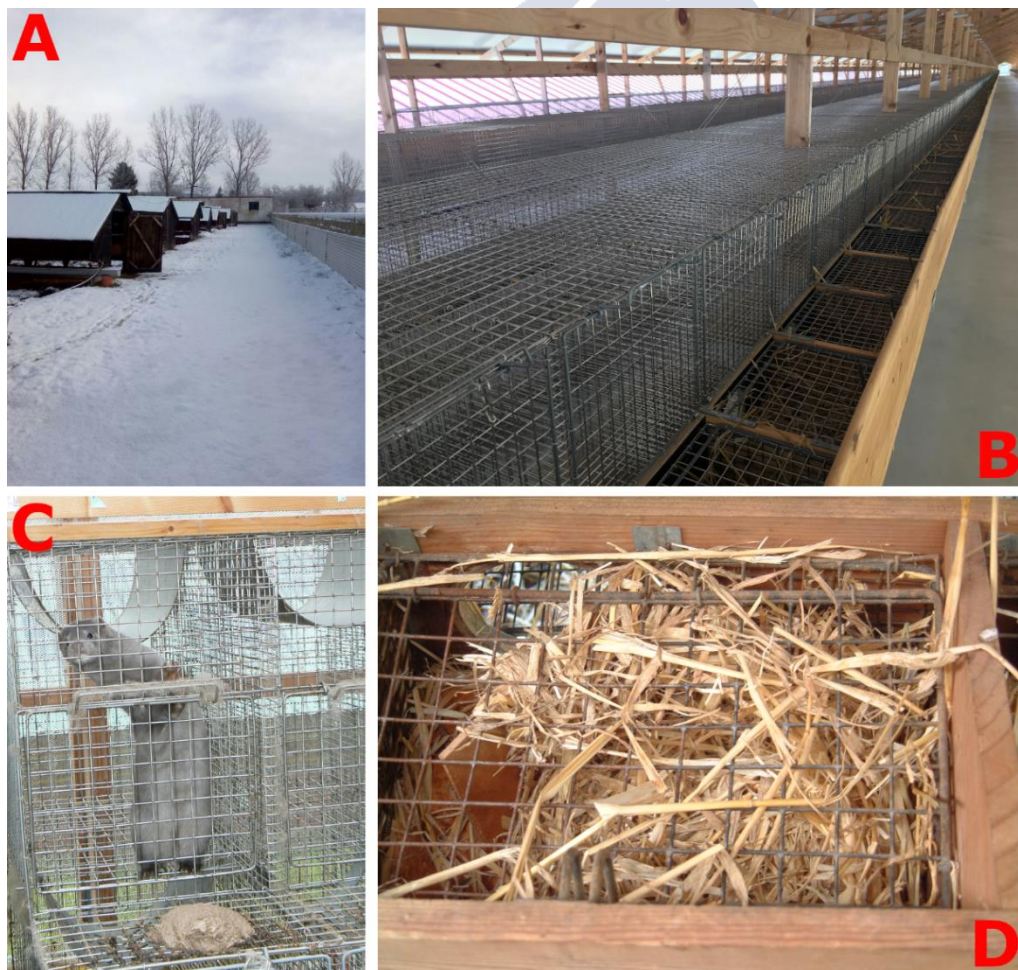
Figura 3. Variedades azules (aleutianas): A) Blue-Iris, B) Sapphire, C) Violet, D) Violet-Cross, E) macho Sapphire x hembra Silver.

**La cría de visón se inició** en Norteamérica a finales del siglo XIX como ya se ha indicado, y posteriormente se expandió a Europa en los años 30 del siglo XX cuando se establecieron las primeras granjas en Dinamarca; a partir de este momento se inició un rápido crecimiento de la actividad, de tal modo que hacia finales del siglo XX la cría de visones se había expandido por buena parte del hemisferio norte (Joergensen, 1985). De manera similar, la cría de visones en el hemisferio sur se inició en Argentina en 1935. **En España** la actividad se inició en 1958 con animales adquiridos en Francia, que fueron el inicio de las granjas localizadas en las cercanías de Madrid y en Galicia (García-Mata, 1990; Palazón y Ruiz-Olmo, 1997). Posteriormente, la cría de visón se expandió a otras regiones de la mitad norte de España como Asturias, Cantabria, Cataluña y País Vasco; pero también a las provincias de Soria, Castellón y Teruel. Con todo, Galicia ha sido y es la comunidad con mayor expansión y continuidad del sector con mucha diferencia, sustentando en la actualidad el mayor censo de granjas y cabaña reproductora en el conjunto de España (Palazón y Ruiz-Olmo, 1997; datos propios no publicados). La distribución actual de granjas y censo reproductor en España se resume en la tabla 2.

Tabla 2. Distribución de granjas y cabaña reproductora en España (2018) (ADSG-AGAVI y datos propios no publicados).

Zona	Nº Granjas	% Granjas	Cabaña	% Cabaña
Galicia	30	83%	120.000	71%
País Vasco	2	6%	50.000	29%
Aragón	1	2,5%		
Comunidad Valenciana	1	2,5%		
Castilla y León	2	6%		
<b>TOTAL ESPAÑA</b>	<b>36</b>	<b>100%</b>	<b>170,000</b>	<b>100%</b>

**La estructura típica de las granjas** de visón en España consta de un terreno lo más llano posible con cierre perimetral y uno o varios accesos (al menos uno de ellos practicable para tractores/camiones), un silo de pienso, un almacén y un número variable de naves o galpones donde se alojan los animales. Estas naves presentan típicamente un tejado a dos aguas, carecen de paredes laterales y su estructura está formada por cerchas generalmente de madera con una separación aproximada de 2,1 m entre ellas. El ancho de la nave es de aproximadamente 4 m con una separación entre naves de 3-4 m. Las jaulas tienen un tamaño de 92 cm de profundidad, 30 cm de ancho y 45 cm de altura, y se montan en baterías de 6/8 jaulas/cercha a ambos lados de un pasillo central. En el frente de la jaula que da hacia el pasillo va acoplado un nido de madera de 23 cm de profundidad, 32 cm de ancho y 16,5 cm de altura, con un orificio circular de comunicación entre jaula y nido de 11-12 cm. El diseño tradicional de granja presenta los suelos de tierra, mientras que en instalaciones más modernas es frecuente que el suelo del pasillo y bajo las jaulas sea de cemento. Algunas granjas disponen también de edificaciones dedicadas a la fabricación del pienso y/o la preparación y secado de las pieles. Algunas de las características mencionadas pueden observarse en la figura 4.



**Figura 4.** aracterísticas estructurales y de diseño de una granja de visones: A) Exterior de una granja con naves de un solo pasillo y cierre perimetral; B) interior de una nave de pasillos múltiples, mostrando cerchas, nidos y jaulas; C) jaula de dos niveles, con bandeja de descanso en el nivel superior; D) interior de un nido, mostrando la abertura de comunicación con la jaula y paja como material de cama.



**En cuanto a la biología del visón**, se trata de un carnívoro que en estado silvestre es un depredador de vida semiacuática que se alimenta de forma generalista de múltiples especies de vertebrados acuáticos y terrestres (Morodd *et al.*, 1988; García-Mata, 1990; Palazón y Ruiz-Olmo, 1997). El aparato digestivo del visón difiere notablemente del de otras especies domésticas: su dentición, propia de un depredador, está adaptada para desgarrar más que para masticar, y presenta un tubo intestinal corto, de una longitud de unas cuatro veces la longitud corporal, lo que provoca que el tiempo de tránsito intestinal sea de tan sólo 3-5 horas. Debido a este hecho, el tiempo de actuación para las enzimas digestivas es más corto que en otras especies y la flora intestinal juega un papel poco importante en la digestión de los nutrientes; por todo ello, el visón necesita alimentos de alta digestibilidad (Joergensen, 1985). El visón de granja se alimenta con pienso húmedo, una especie de pasta o paté con un 60-70% de humedad elaborado en base a subproductos animales procedentes de la industria de alimentación humana tales como aquellos procedentes de la industria cárnica, láctea, avícola y pesquera; de este modo, en España se revalorizan y reciclan unas 35.000 Tm de diferentes subproductos al año (datos propios no publicados). Además, el pienso incluye cereales, concentrados proteicos de origen animal y vegetal y suplementos nutricionales. Debido a la presencia de subproductos animales, el pienso para visón es considerado material SANDACH (Subproductos Animales No Destinados A Consumo Humano), y su producción requiere de autorización previa y registro específico, estando regulado por los reglamentos (CE) nº1069/2009 y (CE) Nº142/2011) y la normativa estatal que los transpone y/o adapta a nuestra legislación (Real Decreto 1528/2012 y Real Decreto 476/2014). Así, este pienso presenta la problemática de higiene propia del material SANDACH y su correcta elaboración se sustenta en sistemas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC).

**El ciclo reproductivo del visón** es anual y está regulado por el fotoperiodo. Tiene una única estación de celo al año, que en el hemisferio norte coincide con el mes de marzo. Se trata de un animal poliéstrico estacional, que puede presentar hasta 3 o 4 ciclos de maduración folicular en intervalos de 6-7 días durante la estación reproductora. La ovulación es inducida por la cópula; sin embargo, incluso aunque se produzcan la cópula y la ovulación, volverá a salir en celo 7-8 días después. Este efecto se debe al fenómeno de implantación diferida: tras las primeras divisiones del óvulo fecundado, el blastocisto permanece en el útero en fase de latencia hasta que una nueva señal hormonal, igualmente dependiente del fotoperiodo, promueve la implantación de éste y el inicio de la gestación. Así, si se producen dos apareamientos en ciclos estrales sucesivos una parte de la progenie procederá del primer apareamiento y otra parte del segundo (en una proporción aproximada del 20-15% y 80-85% respectivamente), fenómeno conocido como superfetación. Estas características condicionan el manejo de la reproducción en la granja, de tal modo que se “sincroniza” el celo en una primera ronda de apareamientos y se realiza una segunda monta 7-9 días más tarde, en el siguiente ciclo, para obtener una ovulación fértil más cercana al periodo de implantación (Joergensen, 1985; Murphy, 1996). En España los apareamientos comienzan a finales de febrero o inicio de marzo. El número de machos reproductores es de 1 por cada 4 o 5 hembras. Para el apareamiento se lleva la hembra a la jaula del macho y se controla visualmente cada 10-20 minutos si están apareando. El apareamiento puede durar desde tan

sólo unos minutos hasta dos horas, siendo más largos a medida que avanza el periodo; no obstante, lo normal es que dure alrededor de 30 minutos. Debido a que los signos del estro no son evidentes, lo habitual es dividir la granja en grupos de tal manera que cada día tiene preasignadas las hembras correspondientes. Las hembras, previamente sometidas a un régimen de alimentación restringida, se sobrealimentan en los días anteriores a ser llevadas al macho (*flushing*). Ocho días después del primer apareamiento se repite el proceso; de este modo el primer apareamiento se emplea para poder predecir la fecha del siguiente ciclo y el segundo como apareamiento efectivo, aunque existen variaciones a este sistema añadiendo apareamientos o posponiendo la fecha para determinados grupos de animales. Los machos reproductores se sacrifican al final del periodo, aproximadamente sobre el 20 de marzo, ya que en los animales adultos la muda de primavera se produce en el mes de abril, formándose el pelo de verano, de menor densidad y escaso valor comercial.

La gestación propiamente dicha, desde la implantación hasta el parto, dura aproximadamente 31 días. Sin embargo, el periodo de gestación aparente (desde la última monta hasta el parto) es muy variable, entre 39 y 75 días, o incluso más. Esta variabilidad puede reducirse notablemente empleando luz artificial hacia el final del periodo de apareamientos, con lo que se adelanta y concentra la implantación y, por consiguiente, los partos, que tienen lugar entre finales de abril y primera mitad de mayo. Al igual que otros carnívoros, la hembra de visón pare crías altriciales (ciegas, sin los conductos auditivos abiertos, prácticamente sin pelo y con una movilidad muy limitada) (Joergensen, 1985; Murphy, 1996). La camada media depende de diversos factores como el tipo de visón, la selección, el manejo de la granja o la presencia de ciertas infecciones como por ejemplo la infección por el virus de la enfermedad aleutiana del visón (AMDV: Aleutian Mink Disease Virus). En España la camada media es de 6-9 crías, pudiendo darse casos excepcionales de hasta 14-16 crías/camada, y el porcentaje de partos se sitúa usualmente entre un 88 y 95% (datos propios no publicados). La mortalidad total desde el parto hasta el destete se ha estimado en granjas de Norteamérica entre un 20-25%, siendo el 50% de dichas pérdidas atribuibles a crías que nacen muertas y un 35% a fallos maternos (Hunter, 2008). Otros estudios realizados en Dinamarca estiman la mortalidad de crías y su distribución según puede verse en la tabla 3.

**Tabla 3. Mortalidad de crías según momento del ciclo productivo (Joergensen, 1985).**

Periodo	Porcentaje
Mortalidad fetal	13%
Crías que nacen muertas	3-4%
Mortalidad en los 3 primeros días de vida	4%
Mortalidad desde el tercer día al destete	2%
Mortalidad desde el destete al sacrificio	2%
<b>TOTAL</b>	<b>25%</b>

Las crías empiezan a ingerir alimento sólido hacia la 4ª semana de vida y aprenden a beber hacia la 6ª semana. La vacunación de las crías se realiza a partir de la 6ª semana de vida; actualmente, en España, se vacunan con una vacuna trivalente frente a enteritis vírica, septicemia hemorrágica por *Pseudomonas aeruginosa* y botulismo tipo C. El destete de las camadas y separación de las crías en grupos de 2-4 animales se produce hacia las 8 semanas de vida (finales de junio-principios de julio); en este momento, los machos pesan aproximadamente 900-1.000 g y las hembras 750-850 g, siendo entonces cuando se alcanza la mayor ocupación de las instalaciones de la granja (cercana o igual al 100%).

El periodo de crecimiento, desde finales de junio hasta mediados de septiembre, abarca 11-12 semanas en las cuales los animales ganan alrededor del 85% del peso a sacrificio (una ganancia de 2.850 y 1.600 g para machos y hembras respectivamente). La muda del pelaje de otoño se hace patente durante los meses de septiembre y octubre, con la caída del pelo y la sustitución progresiva por otro nuevo. Previamente al sacrificio, aproximadamente a mediados de noviembre, se realiza la selección de los reproductores del año siguiente, siendo la tasa de renovación de reproductoras de entre el 40-60%, según la presión de selección que se aplique en cada granja. Típicamente se preseleccionan animales con un buen rendimiento reproductor en apareamientos, partos y lactancia, así como en función del peso y/o longitud corporal. Seguidamente, ya próxima la fecha de sacrificio, se seleccionan según la calidad del pelaje en función de la pureza del color, densidad y longitud del pelo, sedosidad y otras características que afectan a la calidad y valor comercial de la piel.

El sacrificio de los animales se realiza en la propia granja, siendo éste un caso excepcional en una producción ganadera. Esta particularidad está contemplada en la legislación comunitaria (Reglamento CE 1099/2009) y en España se ha transpuesto a la legislación nacional mediante el Real Decreto RD 37/2014. El sacrificio se realiza por asfixia, previo aturdimiento, empleando diversos gases o mezclas de ellos (monóxido o dióxido de carbono procedentes o bien de una fuente pura o bien de gases del escape de un motor de gasolina, dedicado exclusivamente a este fin, previamente filtrados y enfriados). El proceso, aturdimiento y asfixia, tiene lugar en un carro con trampilla abatible y ruedas, para poder ser remolcado a lo largo de la granja. Los cadáveres, que pasan a ser material SANDACH, pueden ser procesados parcial o totalmente en la propia granja o enviados a plantas de procesamiento especializadas en las que se realiza todo el proceso o sólo las fases finales del mismo (desollado, desengrasado y secado de la piel). Una vez seca, la piel deja de ser considerada como material SANDACH. La venta de pieles está centralizada en casas de subasta internacionales, dos en Norte América (Seattle y Toronto) y dos en Europa (Helsinki y Copenhague), de las cuales en 2020 sólo estaban operando las dos casas europeas (SAGA FURS en Helsinki y Copenhagen Fur en Copenhague). En estas casas de subasta, las pieles se identifican de forma individual y a continuación se clasifican por color, talla y calidad, independientemente de su origen, formando lotes uniformes referenciados en un catálogo de venta sobre el que compradores de todo el mundo, tras examinar los lotes de muestra, pujan durante el proceso de subasta; por tanto, se trata de un proceso transparente en el que el

productor obtiene por su producto el precio de subasta una vez deducida la comisión previamente establecida por la casa de subastas.

Una vez finalizado el sacrificio, la granja entra en su fase de baja ocupación, con la mayor parte de las instalaciones vacías. En este momento se inicia el nuevo ciclo, llevando a los animales a su peso adecuado para la temporada de reproducción y acometiendo las labores sanitarias anuales, tales como:

- Mantenimiento, limpieza y desinfección de instalaciones.
- Test serológico anual frente al virus de la enfermedad aleutiana del visón.
- Vacunación frente a moquillo de todas las hembras reproductoras.

El ciclo anual se resume en la figura 5.

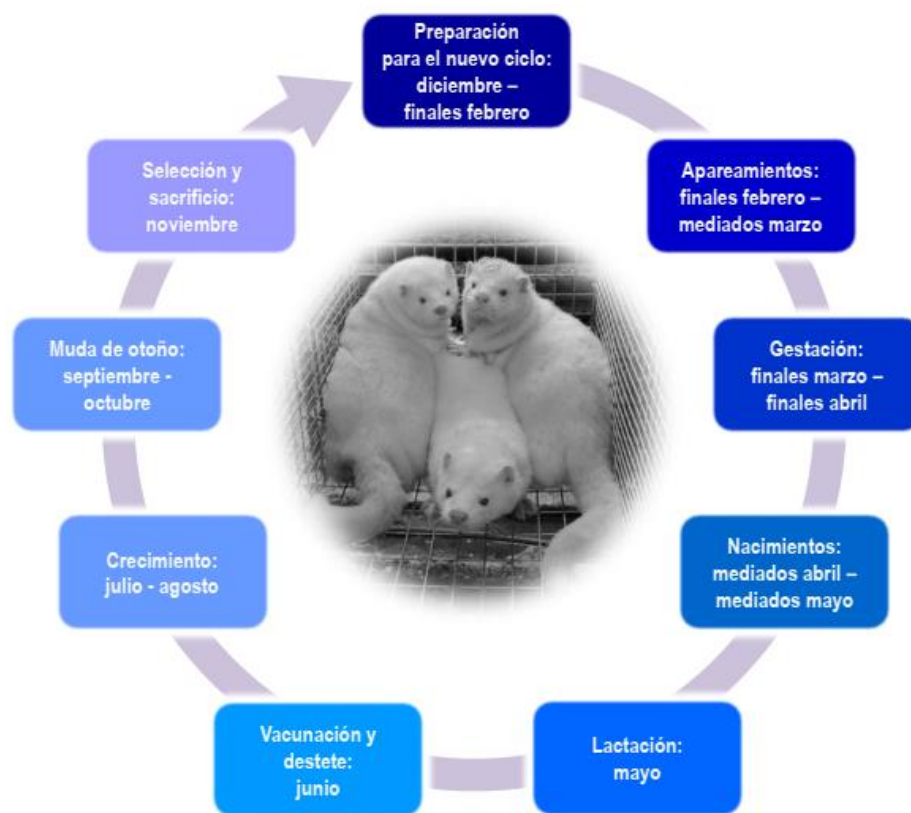
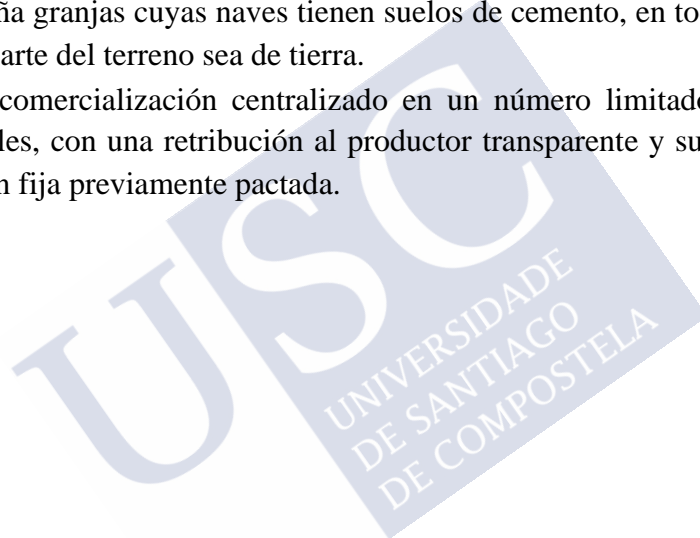


Figura 5. Esquema del ciclo anual en las granjas de visón en España.

A continuación, se resumen algunas de las características más reseñables de esta producción ganadera:

- Ciclo anual, con integración en la propia granja de todas, o casi todas, las etapas productivas. Autoreposición de reproductores.
- Estacionalidad en la ocupación de las instalaciones: 40% de ocupación de diciembre a junio y 100% de ocupación de julio a noviembre. No existe el vaciado total; el único caso de vaciado sanitario se produce excepcionalmente para erradicar de la granja el AMDV, el moquillo u otras enfermedades infecciosas.

- Estacionalidad en el consumo de pienso: 20% del total entre diciembre y mayo; 80% entre junio y noviembre.
- La alimentación, basada en material SANDACH, ayuda a reciclar y revalorizar un volumen importante de subproductos provenientes de la industria de alimentación humana.
- Estacionalidad de la carga de trabajo a lo largo del año, siendo los periodos de máxima carga el mes de enero (limpieza, desinfección, toma de muestras para serología y vacunación), las 3 primeras semanas de marzo (apareamientos), última semana de abril y primera de mayo (partos), final de mayo a mediados de junio (predestete, vacunación y destete) y noviembre (selección y sacrificio).
- Instalaciones abiertas, en las que en la mayoría de los casos las naves no tienen paredes y el suelo es de tierra. Aunque en nuestro país hay granjas con naves de múltiples pasillos, los laterales de estas naves están total o parcialmente descubiertos; igualmente, aunque hay en España granjas cuyas naves tienen suelos de cemento, en todas es común el que al menos una parte del terreno sea de tierra.
- Sistema de comercialización centralizado en un número limitado de casas de subasta internacionales, con una retribución al productor transparente y sujeta sólo a la carga de una comisión fija previamente pactada.



## 1.2. DEFINICIÓN E HISTORIA DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN

### 1.2.1. Definición

La enfermedad aleutiana del visón (AD, por sus siglas en inglés: Aleutian Disease) es, en su forma clásica, una grave alteración inmunitaria que afecta fundamentalmente al visón de granja. Esta enfermedad está producida por un parvovirus (*Carnivore amdoparvovirus 1*) capaz de infectar también a otras especies de carnívoros como mofetas, mapaches, hurones y otros mustélidos (ICTV, 2018b). En la mayoría de los casos, se trata de una infección persistente, y sus consecuencias dependen del genotipo del visón y de la cepa de virus, así como del momento de la infección, la edad del animal, dosis infectiva y estado inmunitario (Porter *et al.*, 1980; Alexandersen *et al.*, 1985b; Jensen *et al.*, 2014; Knuuttila, 2015; Farid y Hussain, 2019). Además de en el visón de granja, la enfermedad clínica se ha descrito en hurones (Kenyon *et al.*, 1966a; Deeney, 2002) y mofetas (LaDouceur *et al.*, 2015).

En el visón adulto y crías destetadas la enfermedad puede seguir un curso crónico y progresivo (forma clásica) caracterizado por una replicación vírica restringida, estimulación continua del sistema inmunitario, plasmocitosis, marcada hipergammaglobulinemia (HGG), formación de inmunocomplejos (IC), glomerulonefritis, nefritis intersticial y arteritis. El animal muere casi siempre por fallo renal o, con menor frecuencia, por las hemorragias ocasionadas por la arteritis o debido a infecciones oportunistas. La tasa de mortalidad en granjas infectadas puede verse multiplicada hasta 3-5 veces respecto a la tasa basal de una granja no infectada (1-2% anual en animales destetados/adultos), afectando también al rendimiento reproductivo y la calidad de la piel. Esta forma de la enfermedad es común a todos los genotipos, pero afecta mucho más a los genotipos aleutianos. En genotipos no aleutianos es más frecuente que la infección, aun siendo persistente, siga un curso inaparente con escasas alteraciones —forma no progresiva de la enfermedad— (Porter *et al.*, 1980; Porter y Cho, 1980; Patel *et al.*, 2012) o, incluso, adopte la forma de infección no persistente (Larsen y Porter, 1975).

En crías recién nacidas de madres no infectadas (esto es, sin anticuerpos maternos) la infección sigue un curso agudo caracterizado por una neumonía intersticial, originada por la infección permisiva (citopática) de los neumocitos tipo II, con altas tasas de morbilidad y mortalidad (más del 90% en el caso de las cepas más virulentas) (Larsen *et al.*, 1984; Alexandersen, 1986).

Debido a la elevada resistencia ambiental de los parvovirus, una vez que una explotación se infecta con AMDV la enfermedad resulta difícil de erradicar (Porter *et al.*, 1980; Cepica y Iwamoto, 2012; Cepica, 2016).

### 1.2.2. Importancia de la enfermedad y repercusiones económicas

La infección de las granjas de visón por este virus causa serias pérdidas económicas debido a un menor rendimiento reproductivo (infertilidad, mortalidad embrionaria y fetal, abortos y mortalidad perinatal), una mayor mortalidad a lo largo de todo el año y una menor calidad del pelaje (Espregueira Themudo *et al.*, 2012; Farid *et al.*, 2012; Knuuttila, 2015;



Wilson *et al.*, 2015). Además, la enfermedad incrementa la susceptibilidad frente a infecciones por otros agentes patógenos e interfiere con la eficacia de la vacunación frente a otras enfermedades debido a la grave alteración que provoca en el sistema inmunitario (revisado por Aasted, 1989); así, cuando se vacunan visones enfermos de AD frente a otros antígenos, los títulos de anticuerpos alcanzados representan sólo el 25% con respecto a animales no infectados (Porter *et al.*, 1980). Además, la forma aguda de la enfermedad en crías recién nacidas cursa con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Alexandersen *et al.*, 1994a).

Por otro lado, deben ser considerados también los costes derivados de las medidas de control y erradicación, así como de las restricciones al movimiento de animales a nivel nacional e internacional (Knuuttila, 2015). Las pérdidas debidas a esta enfermedad se han estimado 10 millones de dólares anuales en Dinamarca (Aasted, 1985) y en 13 millones de euros anuales en Finlandia (Knuuttila, 2015).

En España, las pérdidas globales atribuibles a esta enfermedad pueden estimarse a partir del número de test serológicos realizados (un promedio de 100.000 test anuales en el periodo 2014-2019) y la pérdida productiva en las granjas con infección endémica (alrededor de 15.000 pieles menos por descenso de la fertilidad). En base a estos datos, el coste anual directo de la lucha frente a esta enfermedad en España sumado a las pérdidas directas ocasionadas por la enfermedad en las granjas infectadas supera los 500.000 € anuales en el periodo 2014-2019 para un volumen de facturación anual en torno a los 20.000.000 € (ADSG-AGAVI y datos propios no publicados)<sup>1</sup>.

### 1.2.3. Historia

La historia de la enfermedad comienza en 1941, cuando se detectó por primera vez una nueva mutación de color en una granja del estado de Oregón; los animales con dicha mutación se denominaron como visón aleutiano debido a la similitud de su capa de color gris azulado con la del zorro aleutiano (Gorham, 2000). La combinación del genotipo Aleutiano (aa) con nuevas mutaciones en otros genes que afectan al color dio lugar a nuevas tonalidades, tales como Sapphire (pp, aa), Lavender (bmbm, aa), Blue-Iris (p<sup>s</sup>p<sup>s</sup>, aa ó p<sup>s</sup>p, aa) o Violet (pp, bmbm, aa). A este grupo de mutaciones homocigóticas recesivas para el gen aleutiano se les denominó en conjunto como “visones azules”, siendo animales más sensibles a las enfermedades, que presentan mayor mortalidad, mucho más susceptibles a los abscesos y que resultan en general más complicados de criar (Padgett *et al.*, 1964; Padgett *et al.*, 1967; Leader *et al.*, 1963). Sin embargo, dada la alta cotización de este tipo de pieles en el mercado, las granjas aplicaron intensivos programas de cría y su producción pronto se extendió por toda Norteamérica y Europa (Gorham *et al.*, 1965; Henson *et al.*, 1963).

Unos seis años después del inicio de la cría de la mutación aleutiana, las dificultades para la producción de este tipo de animales eran ya bien conocidas debido a una enfermedad de etiología desconocida caracterizada por un curso lento y debilitante, con pérdida de peso,

<sup>1</sup> Factores como el descenso del valor de la piel, pérdida del valor reproductor o los gastos de desinfección no son tenidos en cuenta en esta estimación.

palidez de mucosas, sangrado bucal, polidipsia-poliuria y diarrea alquitranada. La enfermedad parecía afectar exclusivamente al genotipo aleutiano, por lo que no es extraño que recibiera el nombre de enfermedad aleutiana (Gorham, 2000). El examen microscópico de hígado, bazo y linfonodos reveló una masiva infiltración por células plasmáticas (Helmholtz y Jungherr, 1958; Obel, 1959), por lo que recibió también el nombre de plasmocitosis (Gorham, 2000). La primera descripción de las lesiones características de esta enfermedad fueron hechas por Hartsough en 1946 (Henson *et al.*, 1966b), pero quince años después del inicio de la cría de visón aleutiano era poco lo que se sabía al respecto, y el artículo de Hartsough y Gorham (1956) en el que se compilaba la escasa información disponible ha venido considerándose hasta hoy como la primera descripción de la enfermedad. Inicialmente se creyó que se trataba de una enfermedad hereditaria; sin embargo, la exacerbación de la misma tras el uso de autovacunas frente a moquillo, muy frecuente en aquella época<sup>2</sup>, sugirió una posible causa infecciosa o autoinmune (Hartsough y Gorham, 1956; Karstad y Pridham, 1962). Las primeras pruebas para demostrar la naturaleza infecciosa de la enfermedad mediante infección experimental fracasaron debido a que se realizaron utilizando la cepa Pullman de baja virulencia sobre visones de genotipo no aleutiano, teniendo en cuenta además que en aquel momento las únicas pruebas disponibles para diagnosticar la enfermedad eran la sintomatología clínica, el cuadro lesional y la muerte de los animales (Gorham, 2000). Anecdóticamente, cabe señalar que la notable similitud entre las lesiones de la AD y las enfermedades del colágeno en seres humanos despertaron gran interés por el uso del visón como modelo experimental de dichos procesos en la especie humana (Karstad 1965; Wagner 1963; Henson *et al.*, 1963).

La HGG, sello de identidad de la enfermedad, fue descrita por Obel (1959) y por Henson *et al.* (1961). Este último equipo fue capaz de reproducir la HGG experimentalmente un año más tarde, confirmando observaciones previas según las cuales los genotipos no aleutianos eran también susceptibles a la enfermedad aunque en menor grado. La demostración de que ambos tipos de visón mantenían un perfil de proteínas séricas normal al ser inoculados con suspensiones de tejido de visones sanos, suspensiones de tejidos de visones enfermos, convenientemente inactivados con formol, u otros antígenos, vino debilitar la hipótesis autoinmune y a apoyar la de su naturaleza infecciosa (Henson *et al.*, 1962b).

La etiología vírica de la enfermedad comenzó a quedar de manifiesto a principios de los 60 al demostrarse que el agente causal era filtrable y podía sedimentarse a 95.000 g (Karstad y Pridham 1962; Gorham, Leader y Henson 1964; Henson, Gorham y Leader 1963). Hacia finales de los 60 se demuestra que la mayor parte del virus circulante se encuentra en forma de IC (Porter y Larsen, 1967); también se determina el tamaño del virus y su resistencia a agentes físicos y químicos (Eklund *et al.*, 1968) y se realiza la primera descripción completa de la patogenia de la enfermedad (Porter *et al.*, 1969). Las vías horizontales de transmisión fecal-oral y saliva-aerosol-respiratoria así como la evidencia de una vía de transmisión

<sup>2</sup> Homogeneizados de bazo inactivados con un 0,3-0,5% de formalina; un tratamiento suficiente para inactivar un virus como el del moquillo, pero no para un parvovirus como el AMDV.



vertical también fueron establecidas en esa década (Henson *et al.*, 1963b, 1963a; Gorham *et al.*, 1964; Burger *et al.*, 1965).

Los intentos de aislamiento del virus en cultivos celulares no tuvieron éxito hasta 1977, cuando se logró por primera vez mediante la inoculación de cepas de alta virulencia (Utah-1) en cultivos de la línea celular CRFK (Crandell Feline Kidney) a 31,8°C (Porter *et al.*, 1977; revisado por Gorham y Shen, 1981). Este aislado, denominado AMDV-P, crecía con dificultad y los títulos víricos obtenidos en cultivo eran muy bajos, a pesar de que mantenía su patogenicidad para el visón tras nueve pases *in vitro*. Contrariamente, un segundo aislado de la misma cepa original (Utah-1) obtenido por Gorham (AMDV-G) crecía con gran eficacia en cultivo celular CRKF pero carecía de patogenicidad para el visón, incluso para los genotipos aleutianos (Bloom *et al.*, 1980, 1994). El estudio de este aislado (AMDV-G) condujo a la caracterización definitiva de este virus como parvovirus autónomo (Bloom *et al.*, 1980), lográndose posteriormente la secuenciación de su genoma completo (Bloom *et al.*, 1988).

En relación al diagnóstico de la enfermedad, en 1962 se desarrolló el test de yodo (IAT, Iodine Agglutination Test) (Henson *et al.*, 1962a), una prueba rápida destinada a detectar a los animales con HGG y que había sido diseñada tomando como referencia el test de Mallén empleado en medicina humana para detectar alteraciones en las proteínas séricas (Mallén *et al.*, 1950). El empleo de esta técnica permitió identificar a los animales con HGG asintomáticos y eliminarlos antes del periodo reproductor, con lo que se consiguió así un descenso notable de las tasas de mortalidad y esterilidad (Gorham *et al.*, 1965). En 1972 se puso a punto una técnica serológica basada en electroforesis a partir de antígeno purificado y activado, el test CIEP (contraimmunoelectroforesis) (Cho y Ingram, 1972). Seis años después se publicó el primer trabajo que definía la estrategia de control y erradicación denominada “test y sacrificio” (*test-and-removal*) basada en dicho test, manteniéndose desde entonces este tipo de estrategias de detección y eliminación como dogma de la industria hasta la actualidad (Cho y Greenfield, 1978; Cepica y Iwamoto, 2012).

La mayor susceptibilidad de los genotipos aleutianos no se comprendió hasta los años 60, cuando se descubrió que padecían una anomalía congénita de los leucocitos y otros tipos celulares denominada síndrome de Chediak-Higashi (SCH) que había sido descrita previamente en seres humanos (Leader *et al.*, 1963; Padgett *et al.*, 1964; Beguez-Cesar, 1943, citado por Padgett *et al.*, 1969). No obstante, la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad está probablemente determinada por más factores genéticos que el gen aleutiano, pero dichos factores no han sido todavía dilucidados.

Por otro lado, la forma aguda de la enfermedad, caracterizada por producir una grave neumonía intersticial en crías menores de dos meses y medio nacidas de madres no infectadas, fue descrita por primera vez en 1984 y está asociada la replicación permisiva del virus en animales muy jóvenes y en ausencia de inmunidad maternal (Larsen *et al.*, 1984; Alexandersen *et al.*, 1994a).

Con respecto a su origen, la AD era desconocida antes de la aparición de la mutación aleutiana, ya fuese porque surgió al mismo tiempo que dicha mutación, algo que parece sumamente improbable, o bien porque hasta que comenzó la cría de este tipo de animales la enfermedad había pasado desapercibida o se confundía con algún otro proceso patológico; esta última teoría no es nada descabellada teniendo en cuenta que en las primeras décadas de la cría de visones los mayores problemas en las granjas eran la elaboración de dietas adecuadas y la lucha contra los devastadores brotes de moquillo y botulismo, además de que el genotipo predominante criado hasta aquel momento (Standard-Dark o Wild-Type) es relativamente resistente a la enfermedad y las cepas de virus circulantes en los primeros tiempos eran de baja virulencia. Tampoco está claro si el virus se diseminó desde Estados Unidos hacia Europa y resto de países productores, o si simplemente la cría de estas nuevas variedades aleutianas hizo aflorar las infecciones latentes preexistentes en las granjas o incluso en la fauna silvestre (Karstad y Pridham, 1962; Padgett *et al.*, 1964; Gorham *et al.*, 1965; Henson *et al.*, 1966b). En relación a esto último, un estudio filogenético reciente sugiere que la respuesta a esta cuestión es una historia compleja que involucra tanto al visón silvestre como al comercio internacional del visón de granja (Nituch *et al.*, 2012). En España, aunque se desconoce si los animales inicialmente importados de Francia en 1958 (García-Mata, 1990) estaban o no infectados, el hecho de que en los años 60 se realizaran los primeros ensayos con el IAT podría sugerir que la cabaña de visones fundadores estuviese ya infectada en origen (Juan Varela, comunicación personal 1997).

### 1.3. ETIOLOGÍA

#### 1.3.1. La familia *Parvoviridae*

Los miembros de la familia *Parvoviridae* son virus de pequeño tamaño, resistentes, sin envoltura y con ADN lineal de cadena sencilla de aproximadamente 4-6 kb. Las dos subfamilias que lo forman, *Parvovirinae* y *Densovirinae*, se distinguen por su capacidad respectiva de infectar a vertebrados (aves, reptiles y mamíferos, incluido el hombre) o a invertebrados (insectos, crustáceos y equinodermos). En conjunto comprende 13 géneros y más de 75 especies (ver tabla 4). Al estar muy limitados por su reducido genoma, la mayoría de los parvovirus requieren de células en fase de división activa; además presentan especificidad de hospedador y/o tejido (ICTV, 2018a). Muchos parvovirus están altamente especializados para infectar un tipo particular de célula (Cotmore *et al.*, 2019).

Los criterios para la taxonomía de esta familia han sido compilados por Cotmore *et al.* (2014) y se basan en la comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína no estructural NS1<sup>3</sup>. Para ser encuadrados dentro de la misma especie, los virus deben compartir más del 85% de la secuencia de aminoácidos de la NS1 y deben diferir en más del 15% de los aminoácidos en comparación con virus de otras especies. Al mismo tiempo, se conservan otros criterios preexistentes como el hospedador, las propiedades antigénicas y las características del genoma. En la nueva nomenclatura los nombres de especie típicamente consisten de un taxón de hospedador, una filiación de género y un sufijo numérico, o letra, como por ejemplo *Rodent protoparvovirus 1* o *Carnivore amdoparvovirus 1*.

Las enfermedades animales causadas por parvovirus son diversas: gastroenteritis (subclínica o severa), miositis, miocarditis, hepatitis, neumonía, leucopenia, o enfermedad crónica mediada por inmunocomplejos. Pueden causar también malformaciones congénitas y fallo reproductivo (ver tabla 5). Los parvovirus de mayor importancia veterinaria se encuadran en dos de los géneros de la subfamilia *Parvovirinae*: *Protoparvovirus* y *Amdoparvovirus*, con representantes tales como el virus de la panleucopenia felina (FPV: Feline panleucopenia virus), el parvovirus canino tipo 2 (CPV2: Canine parvovirus 2), el virus de la enteritis vírica del visón (MEV: Mink enteritis virus), el parvovirus porcino (PPV: Porcine parvovirus) y el virus de la enfermedad aleutiana del visón (AMDV). Tres de ellos, FPV, CPV2 y MEV pertenecen a la misma especie *Carnivore protoparvovirus 1*. Típicamente, los parvovirus causan infecciones permisivas de carácter agudo (FPV, CPV2, MEV) de sólo unos días de duración, pero algunos son capaces de persistir durante largos periodos o incluso toda la vida (AMDV, PPV, B19 humano) (revisado por Knuuttila, 2015).

Los viriones, de 23-28 nm de diámetro, presentan una característica estructura icosaédrica. Las cápsides se ensamblan a partir de 60 polipéptidos estructuralmente equivalentes, derivados del extremo C-terminal de una secuencia común de proteína viral (VP). Estas 60 subunidades se coordinan entre sí, conformado doce ejes de simetría 5, veinte de simetría 3 y treinta de simetría 2. La topografía de la superficie capsular es relevante desde

<sup>3</sup> Los parvovirus codifican dos casetes de genes: un gen NS que codifica varias proteínas no estructurales esenciales para la replicación y un gen VP que codifica varias formas de la proteína estructural.

el punto de vista de las propiedades antigénicas, rango de hospedadores, tropismo celular y otros aspectos clave de su ciclo biológico.

Tabla 4. Parvovirus: subfamilias y géneros (adaptado de ICTV, 2018).

Subfamilia	Género	Especie tipo (ejemplo/s)
<b>Parvovirinae</b>	<b><i>Amdoparvovirus</i></b>	<i>Carnivore amdoparvovirus 1</i> (Virus de la enfermedad aleutiana del visón, AMDV)
	<b><i>Aveparvovirus</i></b>	<i>Galliform aveparvovirus 1</i> (Turkey parvovirus, TuPV)
	<b><i>Bocaparvovirus</i></b>	<i>Ungulate bocaparvovirus 1</i> (Bovine parvovirus 1, BPV1; Human bocavirus 1, HBoV1)
	<b><i>Copiparvovirus</i></b>	<i>Ungulate copiparvovirus 1</i> (Bovine parvovirus 2, BPV2; Porcine parvovirus 4, PPV4)
	<b><i>Dependoparvovirus</i></b>	<i>Adeno-associated dependoparvovirus A</i> (adeno-associated virus 5, AAV5)
	<b><i>Erythroparvovirus</i></b>	<i>Primate erythroparvovirus 1</i> (Human parvovirus B19, B19V)
	<b><i>Protoparvovirus</i></b>	<i>Rodent protoparvovirus 1</i> (Minute virus of mice, MVM; Feline parvovirus, FPV; Canine parvovirus, CPV; Mink enteritis virus, MEV; Porcine parvovirus, PPV)
	<b><i>Tetraparvovirus</i></b>	<i>Primate tetraparvovirus 1</i> (Human parvovirus 4, PARV4)
<b>Densovirinae</b>	<b><i>Ambidensovirus</i></b>	<i>Lepidopteran ambidensovirus 1</i> ( <i>Galleria mellonella</i> densovirus, GmDV)
	<b><i>Brevidensovirus</i></b>	<i>Dipteran brevidensovirus 1</i> ( <i>Anopheles gambiae</i> densovirus, AgDV)
	<b><i>Hepandensovirus</i></b>	<i>Decapod densovirus 1</i> ( <i>Penaeus monodon</i> hepandensovirus 1, PmoHDV1)
	<b><i>Iteradensovirus</i></b>	<i>Lepidopteran iteradensovirus 1</i> ( <i>Bombyx mori</i> densovirus 1, BmDV1)
	<b><i>Penstyldensovirus</i></b>	<i>Decapod penstyldensovirus 1</i> ( <i>Penaeus stylirostris</i> penstyldensovirus 1, PstDV1)
	<b>Sin asignar</b>	<i>Orthopteran densovirus 1</i> ( <i>Acheta domestica</i> mini ambidensovirus, AdMADV)

Tabla 5. Manifestaciones de las enfermedades por parvovirus en animales (adaptado de Parrish, 2016).

Virus	Enfermedad
<b>Virus de la panleucopenia felina</b>	Enfermedad generalizada en gatitos, con panleucopenia, enteritis; hipoplasia cerebelosa
<b>Parvovirus canino 1</b> ( <i>minute virus of canines</i> )	Mínima
<b>Parvovirus canino 2</b> (subtipos 2a, 2b, 2c)	Enfermedad generalizada en cachorros; enteritis, miocarditis (raramente), linfopenia
<b>Parvovirus porcino</b>	Nacidos muertos, aborto, muerte fetal, momificación, infertilidad
<b>Virus de la enteritis del visón</b>	Leukopenia, enteritis
<b>Virus de la enfermedad aleutiana del visón</b>	Enfermedad crónica mediada por inmunocomplejos, encefalopatía. Neumonía intersticial en neonatos
<b>Parvovirus de los ratones, <i>minute virus of mice</i> (MVM), parvovirus de las ratas, virus H-1 de las ratas</b>	Infección subclínica o persistente; malformaciones fetales congénitas; síndrome hemorrágico en ratas
<b>Parvovirus del ganso</b>	Hepatitis, miocarditis, miositis
<b>Parvovirus del pato</b>	Hepatitis, miocarditis, miositis
<b>Parvovirus del pollo y del pavo</b>	Enteritis

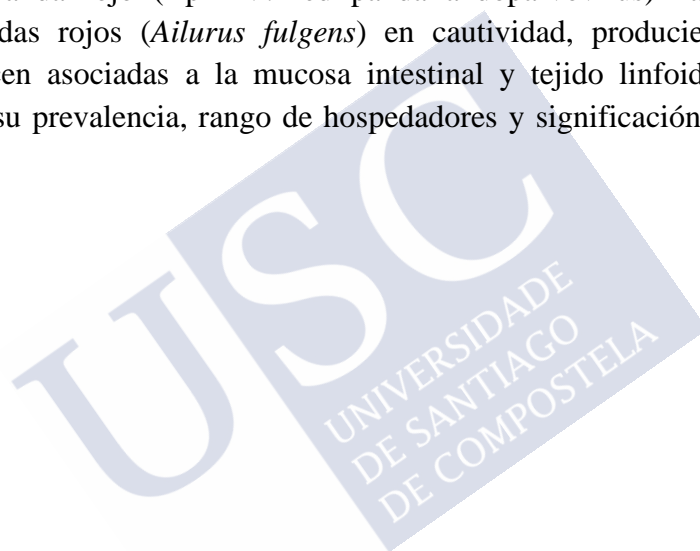
El genoma se compone de una sola hebra de ADN monocatenario (ADNmc) de 4-6 kb (kilo bases), que contiene una larga región codificante flanqueada por sendos telómeros que conforman unas estructuras dinámicas en forma de horquilla (120–600 nt) que son fundamentales en el mecanismo de replicación del ADN vírico (Fig. 9, sección 1.3.3.1). La replicación del ADN se realiza en el núcleo de la célula hospedadora, a través de un mecanismo de "horquilla rodante" que se basa en el despliegue y repliegue secuencial de las horquillas teloméricas a ambos extremos del genoma. La síntesis por desplazamiento unidireccional de la hebra genera dúplex intermedios continuos, a partir de los cuales la actividad endonucleasa de la NS1 escinde las cadenas sencillas de la progenie; a continuación, los genomas de la progenie se empaquetan en partículas víricas preensambladas con la ayuda de la actividad helicasa de la NS1 (Cotmore *et al.*, 2019). Pese a ser virus ADN, los parvovirus presentan una tasa de mutación inusualmente alta, más cercana a la de los virus ARN que a los de ADN de doble cadena; el mecanismo de replicación unidireccional parece evadir las funciones de edición y reparación del ADN que normalmente limitan las tasas de mutación en el ADN celular (ICTV, 2018b; Shackelton *et al.*, 2005). Las tasas de recombinación de los parvovirus son igualmente altas (Canuti *et al.*, 2016; ICTV, 2018b).

### 1.3.2. El género *Amdoparvovirus*

Este género engloba en la actualidad cuatro especies más una pendiente de aprobación (tabla 6); los virus que lo integran infectan a pequeños carnívoros incluidos el visón y otros mustélidos, zorros, mofetas y mapaches (ICTV, 2018a; Canuti *et al.*, 2020). Filogenéticamente, los miembros de este género están más emparentados con el género *Protoparvovirus* que con los demás miembros de la subfamilia *Parvovirinae* (figura 6);

además, el genoma de los amdoparvovirus presenta alguna característica común a todos ellos, como un extremo amino terminal extremadamente corto en la proteína capsular VP1 (ICTV, 2018a; Péntzes *et al.*, 2018).

Como característica particular, algunos de sus miembros son capaces de establecer infecciones persistentes que pueden conducir a una enfermedad mediada por inmunocomplejos. El amdoparvovirus de la mofeta (SKAV: Skun Amdoparvovirus) puede dar lugar al típico cuadro lesional causado por inmunocomplejos, pero generalmente el curso de la enfermedad es subclínico; otros miembros del género como el amdoparvovirus del mapache y el zorro (RFAV: raccoon dog and fox amdoparvovirus) y el amdoparvovirus del zorro gris (GFAV: gray fox amdoparvovirus) han sido menos estudiados, pero también son considerados como patógenos potenciales que producen un espectro de enfermedad compatible con la formación de inmunocomplejos. (ICTV, 2018b). Por último, el amdoparvovirus del panda rojo (RpAPV: red panda amdoparvovirus) ha sido detectado recientemente en pandas rojos (*Ailurus fulgens*) en cautividad, produciendo infecciones persistentes que parecen asociadas a la mucosa intestinal y tejido linfoide; sin embargo, todavía se desconoce su prevalencia, rango de hospedadores y significación clínica (Alex *et al.*, 2018).





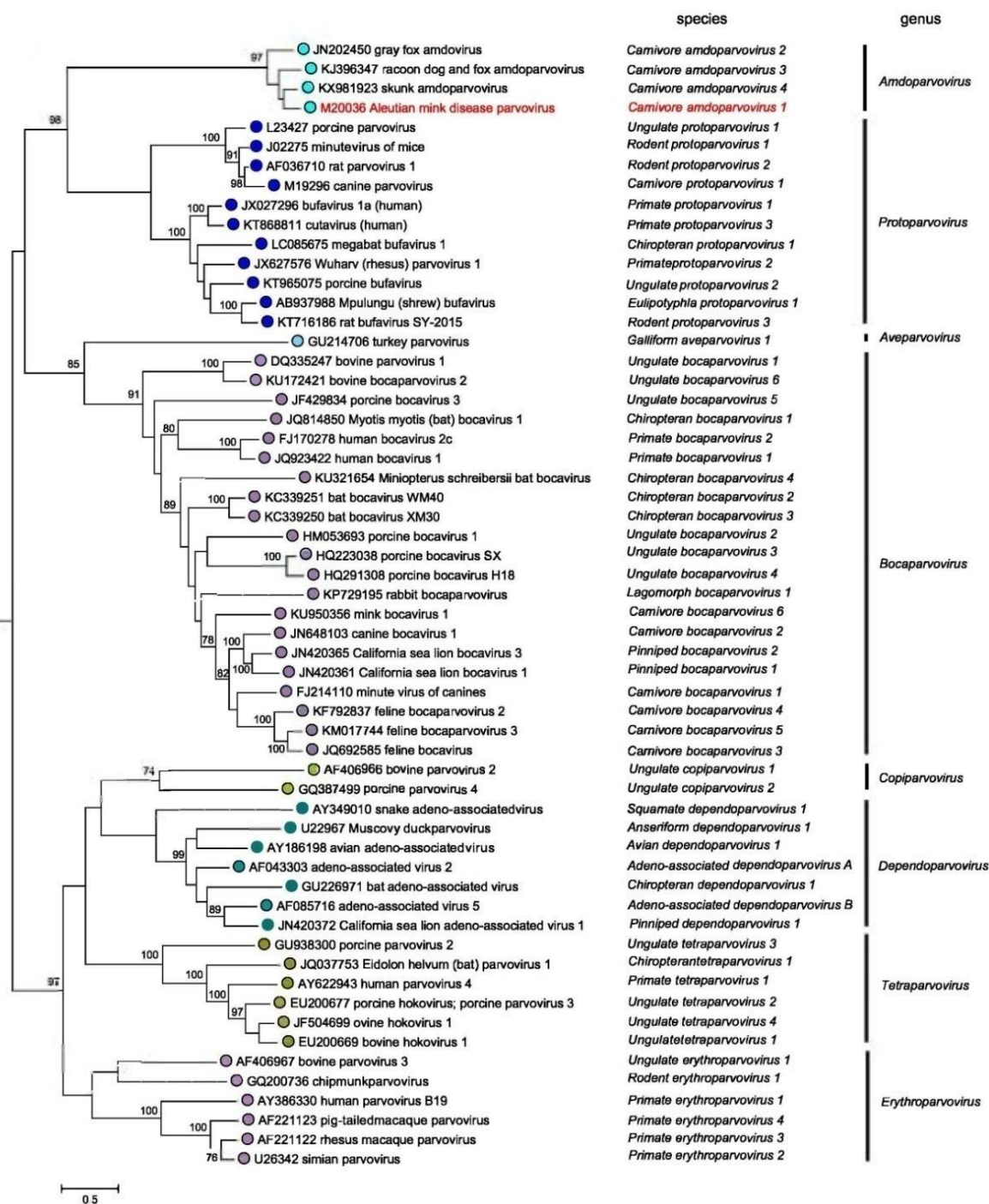


Figura 6. Árbol filogenético de la subfamilia *Parvovirinae* basado en la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 (adaptado de ICTV, 2018b, con licencia CC BY-SA 4.0).

Tabla 6. Especies del género *Amdoparvovirus* (adaptado de ICTV, 2018a).

Género	Especie	Nombre del virus (abreviatura)	Cepa tipo	Número de acceso <sup>1</sup>
<i>Amdoparvovirus</i>	<i>Carnivore amdoparvovirus 1</i>	Virus de la enfermedad aleutiana del visón (AMDV: Aleutian Mink Disease Virus)	ADV-G	M20036
	<i>Carnivore amdoparvovirus 2</i>	Amdoparvovirus del zorro gris (GFAV: Gray Fox Amdoparvovirus)		JN202450
	<i>Carnivore amdoparvovirus 3</i>	Amdoparvovirus del mapache y del zorro (RFAV: <b>Raccoon Dog and Fox Amdoparvovirus</b> )	HS-R	KJ396347
	<i>Carnivore amdoparvovirus 4</i>	Amdoparvovirus de la mofeta (SKAV: Skun Amdoparvovirus)	SK-23	KX981923
<i>Sin clasificar</i>		Amdoparvovirus del panda rojo (RpAPV: Red Panda Amdoparvovirus)		KT878839

1. N° de acceso de la cepa tipo en GenBank (genoma completo).

### 1.3.3. El virus de la enfermedad aleutiana del visón

El AMDV tiene una gran importancia económica en la cría de visón, afectando sobre todo al grupo de visones azules (homocigóticos recesivos para el gen aleutiano); no obstante, la virulencia difiere notablemente entre cepas y según el genotipo del animal. Este virus es el único miembro de este género que ha sido cultivado, purificado y estudiado a nivel molecular. Entre todas las cepas reconocidas, la AMDV-G es la mejor adaptada al cultivo celular y presenta la particularidad de ser apatógena incluso para el visón de genotipo aleutiano (ICTV, 2018b).

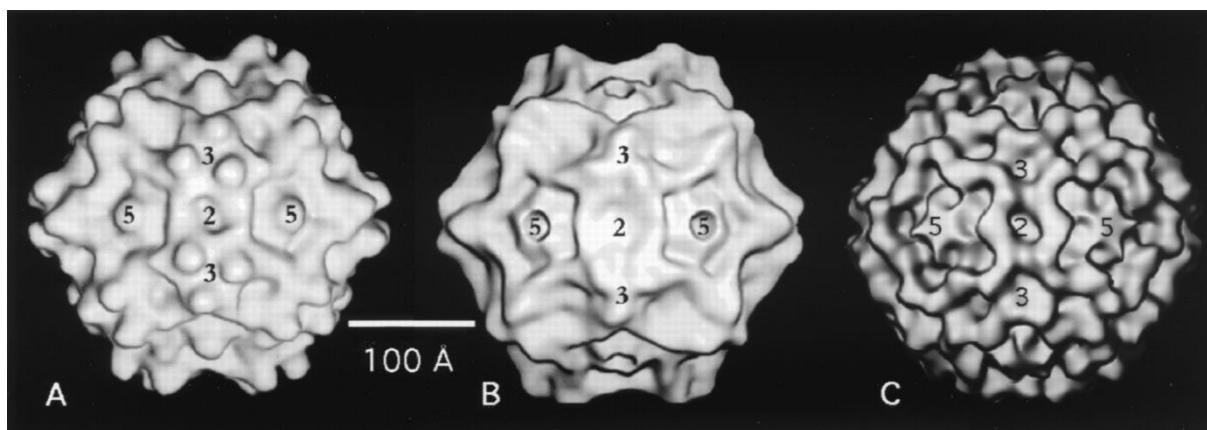
#### 1.3.3.1. Estructura

El virus de la enfermedad aleutiana del visón es un virus desnudo, esférico, de 22–26 nm de diámetro (Aasted, 1980; Bloom *et al.*, 1980)(Aasted, 1980; Bloom *et al.*, 1980). Su cápside está formada por 60 unidades de proteínas capsulares en una proporción VP1:VP2 de aproximadamente 1:9, que son capaces de autoensamblarse formando los viriones (Clemens *et al.*, 1992). La proteína capsular VP2 tiene 647 residuos de aminoácidos, mientras que la VP1 comparte enteramente la secuencia de la VP2 pero contiene además una secuencia única de 43 aminoácidos en su extremo amino (Bloom *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2014). Ambas proteínas son dianas de la respuesta humoral (Bloom *et al.*, 2001). Las proteínas de la cápside son degradadas *in vivo* por acción de las proteasas sin perder por ello capacidad infectiva, al igual que sucede con los viriones del AMDV-G obtenidos en cultivo celular y tratados con tripsina; el suero de los visones infectados contiene altos títulos de anticuerpos dirigidos específicamente contra esta forma proteolizada del virus (revisado por Cotmore y Tattersall, 1987). A diferencia de otros parvovirus, la VP1 no contiene un dominio fosfolipasa A<sub>2</sub> (Cotmore & Tattersall, 2014); esta carencia parece una característica común al género *Amdoparvovirus* (Li *et al.*, 2011), lo que podría reflejar un mecanismo de liberación viral desde los endosomas diferente de otros parvovirus (Zádori *et al.*, 2001).

La estructura tridimensional de la cápside del AMDV-G ha sido determinada a partir del autoensamblado de la proteína VP2 obtenida por recombinación mediante criomicroscopía



electrónica y técnicas de reconstrucción de imagen (figura 7). El AMDV se diferencia de otros parvovirus en la exagerada respuesta inmunitaria que provoca, respuesta que pese a lo cual no es capaz de neutralizarlo. Una posible explicación podría estar en su topografía, que presenta pronunciados montículos alrededor de los ejes de simetría 3, ausentes o menos pronunciados en otros parvovirus que sí pueden ser neutralizados *in vivo*, y que parecen servir de señuelos que de algún modo evitan que se produzca una respuesta protectora (McKenna *et al.*, 1999).



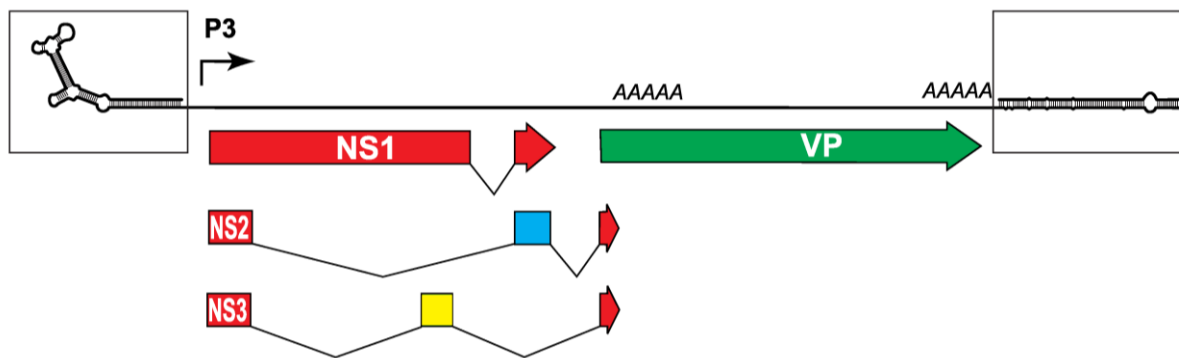
**Figura 7.** Representaciones de los parvovirus AMDV-G<sub>vp2</sub> (A), CPV (B) y B19 (C) centradas sobre un eje de simetría 2 (resolución de 22, 21 y 26 Å respectivamente). Se indican las ubicaciones de algunos de los ejes icosaédricos de simetría 2, 3 y 5 (adaptado de McKenna *et al.*, 1999, con permiso de American Society for Microbiology).

El AMDV fue el primer parvovirus en el que se identificó la presencia de proteínas no estructurales asociadas a la replicación del virus en las células (Best & Bloom, 2006; Bloom, Race, & Wolfenbarger, 1982). Las proteínas no estructurales NS1/2/3 comparten 59 residuos de aminoácidos en su extremo amino y presentan un extremo carboxílico único para cada una de ellas, constando de 641, 114 y 92 aminoácidos respectivamente (Huang *et al.*, 2014; Xi *et al.*, 2016). En el AMDV se ha demostrado que la NS1 posee actividad nicasa, ATPasa y helicasa, así como dominios de unión al ATP y al ADN; esta proteína se localiza en el núcleo y es crucial para la replicación viral, la regulación de la transcripción y el ensamblado de la cápside (Bloom *et al.*, 1988; Christensen *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2014b; Xi *et al.*, 2016). En comparación con otros parvovirus, la NS1 del AMDV presenta una alta variabilidad (Gottschalck *et al.*, 1994; Xi *et al.*, 2016); en general, la zona central está relativamente bien conservada entre las diferentes cepas estudiadas, mientras que los extremos presentan una mayor variabilidad (Gottschalck *et al.*, 1994). En cuanto a las demás proteínas no estructurales, la NS2 se localiza también en el núcleo, mientras que la NS3 es producida a bajos niveles y tiene una localización extranuclear, y ambas juegan un papel crucial para la replicación vírica (Huang *et al.*, 2014).

El genoma del AMDV está formado por una cadena lineal de ADNmc, heterotelomérico, de alrededor de 4,7-4,8 kb (Figura 8), siendo predominantemente ADN de sentido negativo (~95%). La cadena de ADN está flanqueada a ambos lados por secuencias palindrómicas que forman sendos telómeros que se pliegan en forma de horquillas (figura 8) (Xi *et al.*, 2016;

ICTV, 2018b). La horquilla izquierda es de 116 nt, tiene forma de “Y” y actúa como cebador para las polimerasas, mientras que la horquilla derecha es de 242 nt, se pliega en forma de “U” y contiene la zona de reconocimiento del dominio nicasa de la NS1 (Xi *et al.*, 2016). El genoma del AMDV posee tres marcos de lectura abiertos (ORF). Un promotor transcripcional situado cerca del extremo izquierdo del genoma genera un pre-ARNm único, que se procesa de manera variable utilizando tres patrones de corte y empalme diferentes y dos sitios de poliadenilación alternativos. Esto produce seis clases distintas de ARNm, dos que expresan la proteína NS1, dos que pueden expresar la proteína NS2 o las proteínas de la cápside VP1 y VP2, y las dos restantes que expresan o bien la proteína NS3 o bien la VP2 (Qiu *et al.*, 2006; revisado por Canuti *et al.*, 2015; revisado por ICTV, 2018a).

Recientemente se ha conseguido secuenciar el genoma completo de la cepa altamente patógena AMDV-BJ, aislada de una granja en el norte de China, siendo la primera vez que se consigue la secuenciación completa del genoma de una cepa patógena del AMDV (Xi *et al.*, 2016).



**Figura 8.** El genoma heterotelomérico de AMDV se muestra como una línea única que termina en estructuras de horquilla enmarcadas en cajas. Los principales marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican proteínas se muestran como cuadros con flechas, algunos de los cuales están vinculados mediante empalme para crear proteínas auxiliares. Las regiones de ORF1 sombreadas en rojo codifican toda la proteína iniciadora de la replicación NS1 y contribuyen con el primer y el tercer intrón de NS2 y NS3. Las secciones de ORF3 sombreadas en verde codifican las proteínas de la cápside, VP, mientras que las secciones exclusivas de la proteína auxiliar NS2 son azules. Las regiones de ORF2 únicas para NS3 son amarillas. Las flechas sólidas representan promotores transcripcionales; AAAAA indica sitios de poliadenilación (adaptado de ICTV, 2018b, con licencia CC BY-SA 4.0).

La región del genoma ubicada entre las posiciones 3036 y 3196 del genoma del ADMV-G (53 aminoácidos) muestra una tasa de variación excepcionalmente alta y se denomina región hipervariable (RH) (Bloom *et al.*, 1988a; Oie *et al.*, 1996), y más especialmente la comprendida entre los aminoácidos 230-244 de la VP2 (Li *et al.*, 2012; Xi *et al.*, 2016; Jakubczak *et al.*, 2017). Cuando se compara esta región de la cepa ADMV-G (apatógena y adaptada a cultivo celular) con la Utah-1 (de alta patogenicidad) la divergencia es notable (8 de 11 aminoácidos), sugiriendo que puede contener determinantes responsables de la distinta patogenicidad entre estas cepas (Bloom *et al.*, 1988a; Oie *et al.*, 1996). Sin embargo, una comparación análoga del AMDV-G con la cepa altamente patógena AMDV-TR mostró una

secuencia prácticamente idéntica, por lo que la patogenicidad de las cepas no puede estar únicamente ligada a esta región del genoma (Oie *et al.*, 1996).

Al igual que otros parvovirus, la replicación del AMDV es dependiente de la fase S del ciclo celular, requiriendo células en fase de división activa para producir nueva progenie (revisado por Canuti *et al.*, 2015). El mecanismo de replicación es mediante horquillas rodantes, el general de todos los parvovirus (ya descrito en la sección 1.3.1).

#### 1.3.3.2. Diversidad del AMDV

La infección por AMDV produce una respuesta inmunitaria que no es específica para las diferentes cepas de AMDV, incluida la cepa AMDV-G adaptada a cultivo celular, pero es no obstante posible producir anticuerpos monoclonales capaces de diferenciar unas cepas de otras (Aasted, Avery, & Cohn, 1984; Aasted, Race, & Bloom, 1984; Race *et al.* 1986).

Como aproximación, las diferentes cepas de AMDV pueden ser categorizadas dentro de cuatro clases en base a su virulencia para el visón: ninguna, baja, moderada y alta (tabla 7) (Knuuttila, 2015). Hadlow *et al.* (1984) infectaron visones aleutianos y no aleutianos con cuatro cepas de distinta virulencia (Utah-1, Ontario, Montana y Pullman) y encontraron que las cuatro infectaban fácilmente a los visones de ambos genotipos, pero no todas causaron enfermedad en el genotipo no aleutiano: las cepas Utah-1 y Ontario condujeron casi invariablemente al desarrollo de enfermedad y muerte, mientras que la cepa Montana mostró una virulencia intermedia y la cepa Pullman rara vez produjo enfermedad; sin embargo, las cuatro cepas fueron igual de virulentas para el genotipo aleutiano. Las cepas de alta virulencia, tal y como se definen en otros trabajos, se caracterizan por causar neumonía intersticial en crías sin anticuerpos maternos con una morbilidad/mortalidad cercana al 100%, mientras que estos porcentajes son muy inferiores en cepas de baja virulencia (Gottschalck *et al.*, 1991).

Cuando se desarrolla la enfermedad, el desenlace final es el mismo cualquiera que sea la cepa o el genotipo del visón, aunque éste último juega un papel importante en el resultado final. Las cepas más virulentas inducen mayores alteraciones del sistema inmunitario (niveles más elevados de hipergammaglobulinemia) y un cuadro lesional más temprano, es decir, una progresión más rápida (revisado por Knuuttila, 2015). Las cepas de campo son, en general, de baja o media virulencia, pero ocasionalmente se producen brotes severos de rápida propagación como ocurrió con el AMDV-K y -TR (Alexandersen *et al.*, 1994a; Oie *et al.*, 1996). A nivel molecular no existe en la actualidad un criterio oficial de tipificación de cepas para el AMDV (Knuuttila, 2015), y todas las estudiadas parecen ser antigénicamente similares (Tijssen *et al.*, 2012). Así, aunque los determinantes de patogenicidad y virulencia han sido estudiados en numerosos trabajos (Oie *et al.*, 1996; McKenna *et al.*, 1999; Bloom *et al.*, 2001) y algunos han sido localizados en regiones específicas de la cápside, la dilucidación de estos mecanismos parece compleja y serán necesarias nuevas investigaciones antes de llegar a comprenderlos (Knuuttila, 2015).

Los virus ADNmc se caracterizan por su alto grado de diversidad genética y evolucionan a velocidades cercanas a las observadas en virus ARN (Duffy *et al.*, 2008), habiéndose

estimado que la tasa de sustitución<sup>4</sup> en los parvovirus es de  $10^{-4}$  sustituciones por sitio y año (Shackelton *et al.*, 2005; Zehender *et al.*, 2010). Esta tasa es incluso superior en el AMDV (entre  $1,88 \times 10^{-3}$  y  $9,05 \times 10^{-4}$  dependiendo de la parte del genoma estudiado), lo que podría estar originado por las condiciones de cría intensiva en las que cabe esperar una mayor cantidad de ciclos de replicación por año (Virtanen *et al.*, 2019). Otro mecanismo que incrementa la variación genética es la recombinación, mediante la cual se generan genomas quiméricos a partir de la infección de una misma célula por dos cepas diferentes (Shackelton *et al.*, 2007). La recombinación ha sido demostrada en el AMDV y es una de las causas de la falta de congruencia entre los árboles filogenéticos construidos sobre diferentes fragmentos del genoma; sin embargo, según el fragmento usado en la construcción del árbol, muchos subgrupos de estos árboles mantienen su cohesión aún cuando cambian de clado, lo que sugiere que algunos de los eventos de recombinación tuvieron lugar en un pasado lejano (Canuti *et al.*, 2016; Virtanen *et al.*, 2019).



---

<sup>4</sup> La tasa de sustitución es el número de cambios mutacionales fijados por sitio y unidad de tiempo (generalmente, año). (Duffy *et al.*, 2008).

**Tabla 7. Descripción de las principales cepas de AMDV usadas con fines diagnósticos o de investigación (adaptada de Knuuttila, 2015).**

Cepa	Virulencia	Enfermedad clínica	Origen	Año (región /país)	Referencia
AMDV-G	No	No	Clon del Utah-1 adaptado a cultivo	Finales de los 70 (USA)	(Bloom <i>et al.</i> , 1980; Oie <i>et al.</i> , 1996)
AMDV-Pullman	Baja	Sobre todo visones (aa)	Bazo	1961 (Washington , USA)	(Bloom <i>et al.</i> , 1975; Gorham <i>et al.</i> , 1964; Hadlow <i>et al.</i> , 1983)
AMDV-F	Visión: no Hurón: baja	En hurones	Bazo de un hurón	Inicio de los 80 (USA)	(Porter <i>et al.</i> , 1982)
AMDV-P	Moderada	En visones (aa). Baja en visión no (aa)	Clon del Utah-1 adaptado a cultivo	1970s (USA)	(Bloom <i>et al.</i> , 1980; Porter <i>et al.</i> , 1977)
AMDV-Montana	Moderada	En visones (aa). Baja en visión no (aa)	Bazo	1973 (Montana, USA)	(Hadlow <i>et al.</i> , 1983)
AMDV-SL3	Moderada	En visión (aa)	Médula ósea	Inicio de los 80 (Alemania)	(Haas <i>et al.</i> , 1990; Schuierer <i>et al.</i> , 1997; van Dawen <i>et al.</i> , 1983)
AMDV-GL	Variable	No en visión adulto; neumonia en crías	Aislado de cultivo celular a partir del AMD-G	1980s (Dinamarca)	(Alexandersen, 1990)
AMDV-Utah-1	Alta	Visones de todos los genotipos	Bazo de 30 visones	1963 (Utah, USA)	(Hadlow <i>et al.</i> , 1983; Porter <i>et al.</i> , 1969)
AMDV-K	Alta	Visones de todos los genotipos	Pulmón, hígado y bazo de 40 crías de visión	1982 (Dinamarca)	(Alexandersen, 1986, 1990)
AMDV-Ontario	Alta	Visones de todos los genotipos	Bazo, hígado y riñón	1961 (Ontario, Canadá)	(Hadlow <i>et al.</i> , 1983)
AMDV-TR	Alta	Visones de todos los genotipos	Linfonodo mesentérico	1990s (Utah, USA)	(Oie <i>et al.</i> , 1996)
AMDV-United	Alta	Visones de todos los genotipos	Se piensa que procede el Utah-1	ND (Madison, USA)	(Gottschalck <i>et al.</i> , 1994)
AMDV-BJ	Alta	Visones de todos los genotipos	Riñón de crías recién nacidas	2015 (China)	(Xi <i>et al.</i> , 2016)
AMDV-LN1/2/3	Variable	Visones de todos los genotipos	Linfonodos	2009 (China)	(Li <i>et al.</i> , 2012)

Abreviaturas: AMDV, Aleutian mink disease virus; ND, sin datos.

#### 1.3.3.3. Resistencia

Los parvovirus en general son excepcionalmente resistentes, a menudo permaneciendo infecciosos en el ambiente durante meses o años. Estos virus han desarrollado soluciones estructurales que integran dos características opuestas: alta resistencia ambiental, que les facilita la transmisión entre hospedadores, y una flexibilidad en el ambiente intracelular que les permite liberar el ADN viral, paso necesario para la replicación (Ros *et al.*, 2006). Son relativamente resistentes a la temperatura (por ejemplo  $<55^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos), particularmente en extractos tisulares crudos. Generalmente toleran rangos de pH de entre 3 y 9, y son también resistentes a los solventes orgánicos. Sin embargo, son sensibles a la radiación ultravioleta (ICTV, 2018a), y son inactivados por el formol, la  $\beta$ -propiolactona, la hidroxilamina y compuestos oxidantes tales como el hipoclorito sódico, aunque los agregados de virus son algo más resistentes (Tijssen *et al.*, 2012).

En su estudio sobre la inactivación del parvovirus MVM Boschetti *et al.* (2003) consideran tres mecanismos principales:

- Completa desintegración de la cápside.
- Cambios sutiles en los dominios de unión a las células en la superficie capsular.
- Completa destrucción del genoma.

Estos autores observaron que los agregados del MVM retenidos por filtración conservaban una capacidad infectiva que había sido totalmente eliminada de la fracción filtrada (virus no agregados) tras someterlas en ambos casos a un tratamiento con NaOH 0,1 M (pH>12). Los autores atribuyen la relativa estabilidad de los parvovirus a la ausencia de envoltura lipídica, a su pequeño tamaño y su sencilla arquitectura. Hay que mencionar aquí que los virus, en general, pueden desarrollar resistencia a los desinfectantes por formación de agregados, y también puede ocurrir que se seleccionen mutaciones resistentes en presencia de un determinado desinfectante (McDonnell y Russell, 1999).

Mani *et al.* (2007) demostraron que la inactivación del parvovirus humano B19, considerado como uno de los parvovirus más sensibles, mediante la acción de agentes físicos moderados, como calentamiento a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos o pH=4 durante 2 horas, se produce por externalización del ADN y disociación de la cápside, manteniéndose intacta esta última. Este modelo de externalización del ADN fuera de la cápside por acción calor parece común a muchos parvovirus (figura 9). Por otro lado, el calentamiento a  $85^{\circ}\text{C}$  produce la desintegración de la cápside, pero no del ADN (figura 10). Es de resaltar que existe la posibilidad de que el ácido nucleico liberado de su cápside pueda seguir siendo infectivo en el caso de algunos virus (McDonnell y Russell, 1999; Eterpi *et al.*, 2009).



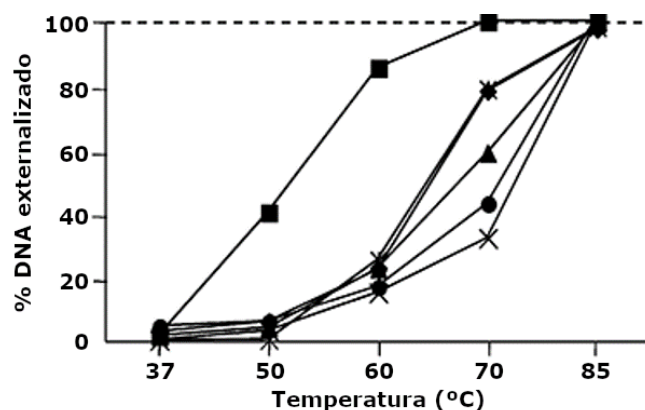


Figura 9. Patrón de externalización de ADN de diferentes parvovirus en respuesta al aumento de la temperatura durante 3 minutos. La cantidad de ADN externalizado se cuantificó mediante hibridación-extensión. Los porcentajes del ADN vírico van referidos a la cantidad total detectada después del tratamiento a 85 °C ( $10^5$ - $10^6$  moléculas/ $\mu$ l para todos los virus). (■) B19V; (●) Bovine parvovirus; (◆) Canine parvovirus; (▲) H1 parvovirus; (x) MVM; (\*) Porcine parvovirus (adaptado de Mani *et al.*, 2007, con permiso de John Wiley and Sons).

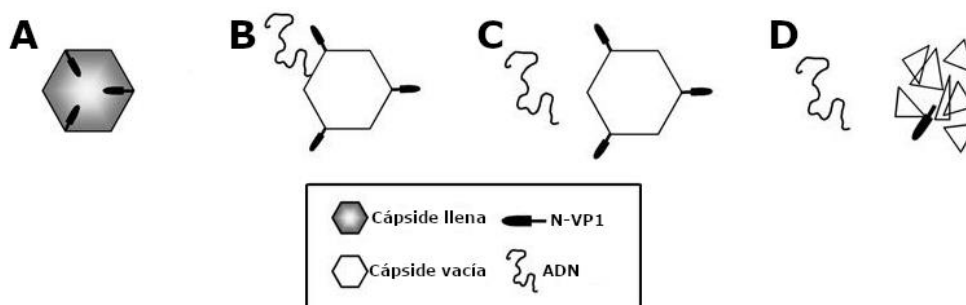


Figura 10. Representación esquemática de las transiciones estructurales de la cápside del parvovirus B19 durante la inactivación. La primera reorganización estructural tras el tratamiento con calor moderado o pH bajo es la externalización de las secuencias N-VP1 y la accesibilidad del ADN viral. A temperaturas más altas o condiciones más ácidas, el ADN se disocia de la cápside. Finalmente, la partícula viral se desintegra (adaptado de Mani *et al.*, 2007, con permiso de John Wiley and Sons).

Los efectos de los desinfectantes sobre el AMDV no han sido extensivamente estudiados (Shen *et al.*, 1981; Canuti *et al.*, 2015). Está demostrado que **el AMDV resiste** diversos tratamientos físicos y químicos, como el éter, fluorocarbono, pH 3, ácido deoxicólico (un ácido biliar), digestión por nucleasas y proteasas, 1% de cloramina, 2% de 2-fenilfenol y diversos protocolos de calentamiento que van desde 56°C durante 30 minutos a 99,5°C durante 3 minutos (revisado por Knuuttila, 2015). Por otro lado, **es sensible** a la formalina al 1-2%, al desinfectante O-Syl al 3% (desinfectante fenólico), al glutaraldehído al 2% (testado sólo en ausencia de materia orgánica; los autores asumen que en presencia de materia orgánica su eficacia aumenta) y a las soluciones de NaOH al 0,5, 1 y 2% (Shen *et al.*, 1981).

Sin embargo, en condiciones de granja, las soluciones de NaOH de concentración igual o inferior al 1% no inactivan el virus, mientras que una concentración del 2% sí es eficaz (Haagsma, 1969; revisado por Gorham *et al.*, 1976). El hipoclorito sódico a una concentración de 6.000 ppm inactiva el virus en ausencia de materia orgánica pero no en presencia de la misma, y lo mismo ocurre con una solución de yodo del 0,5% (Shen *et al.*, 1981). En cuanto a los agentes físicos, el virus es sensible a la luz ultravioleta y al calentamiento a 80°C durante 24 horas y a 65°C durante 3 días (Hussain *et al.*, 2014; revisado por Knuuttila, 2015). Hussain *et al.* (2014) demostraron que el virus puede ser inactivado por el calor generado durante el compostaje del estiércol de visón, si bien la desigual distribución de temperatura en las pilas de compostaje imposibilita su aplicación práctica en tanto no se desarrolle un método que asegure una temperatura uniforme en toda su masa.

Cho e Ingram (1974) demostraron que el antígeno activado (las partículas de AMDV liberadas de los inmunocomplejos) es más sensible al calor que el no activado, perdiendo por completo su capacidad antigénica por calentamiento a 70°C durante 60 minutos o a 80°C durante 15 minutos. Sin embargo, Porter *et al.* (1977a) encontraron que la resistencia al calor y a los agentes químicos de la cepa AMDV obtenida de cultivo celular y la del virus ligado a inmunocomplejos obtenido de visones con infección crónica eran similares.

En condiciones de granja, algunos desinfectantes como el formol, el glutaraldehído y las soluciones de NaOH al 2% se han utilizado con éxito para desinfección de los equipos de granja (datos propios no publicados). Desinfectantes oxidantes tales como el Virkon® o el Parvocide®, la vaporización con formol y el quemado con llama son también otros sistemas de desinfección usados en condiciones prácticas de granja (Knuuttila, 2015).



## 1.4. EPIDEMIOLOGÍA

### 1.4.1. Distribución mundial y prevalencia

El AMDV estuvo seguramente presente en el visón silvestre mucho antes del inicio de su cría en cautividad; sin embargo, la enfermedad sólo se hizo visible cuando se inició la cría de las variedades azules (Gorham *et al.*, 1976). Los estudios moleculares sobre divergencia genética entre cuatro tipos diferentes del AMDV parecen indicar que el AMDV ha infectado al visón desde mucho tiempo atrás (Gottschalck *et al.*, 1994). En la actualidad, el AMDV está presente en América del Norte, Sudamérica, Europa y Asia, en todos aquellos países donde se cría o se ha criado visón americano (García-Mata, 1990; Canuti *et al.*, 2015; Knuuttila, 2015).

En la tabla 8 se resumen algunos datos de prevalencia de la infección por AMDV en granjas de visón de distintos países. Estos datos deben ser interpretados con conocimiento de las condiciones de testaje subyacentes en cada país o región, ya que las granjas con infección endémica no suelen analizar para la prevalencia de la infección, y las granjas con una zona positiva y otra negativa sólo testan esta última zona. Por dicha razón, el porcentaje de granjas negativas de un país es más expresivo de la situación sanitaria real que los valores globales de prevalencia; no obstante, una parte sustancial de los datos de prevalencia vienen expresados como porcentajes globales, por lo que en la tabla 8 pueden verse datos en ambos formatos, especificándolo para cada caso. En España, el porcentaje de granjas negativas se mantuvo alrededor del 10-15% en el periodo que va desde mediados de la década de 1990 hasta el año 2012. Entre 2012 y 2019, en coincidencia con una fase expansiva del sector, se produjeron tres brotes epizooticos de alta infecciosidad que hicieron impracticable la eliminación de la infección mediante la estrategia de “test y sacrificio”, lo que conllevó un incremento en el número de granjas con infección endémica; de este modo, tras la campaña de invierno de 2019 había un 22% de granjas positivas, teniendo en cuenta tanto las granjas con infección endémica como las que presentaron brotes esporádicos (AGAVI y datos propios no publicados).

**Tabla 8. Prevalencia de la enfermedad aleutiana en granjas de visón en diferentes países (porcentaje de positivos sobre el total de muestras analizadas, si no se especifica otra cosa).**

Área geográfica	Prevalencia (%) y n° de test/granjas	Técnica	Periodo	Referencia
Canada (Nueva Escocia)	1-5 (3.000.000)	CIEP	1998-2005	(Farid <i>et al.</i> , 2012)
Canada (Nueva Escocia)	24-71 <sup>a</sup>	CIEP	1998-2005	(Farid <i>et al.</i> , 2012)
Canada (Ontario)	46	CIEP	1970-1980	(Cho y Greenfield, 1978)
	14-60		1986-2006	(Nituch <i>et al.</i> , 2012)
Dinamarca	15 <sup>a</sup>	CIEP	1996	(Espregueira Themudo <i>et al.</i> , 2012)
	5 <sup>a</sup>	CIEP	2001	(Christensen <i>et al.</i> , 2011)
Irlanda	80 <sup>a</sup>	PCR	2006	(Jahns <i>et al.</i> , 2010)
Finlandia	3-14 (500-600 mil)	CIEP	2000-2012	(Knuuttila <i>et al.</i> , 2014)
	15 (700.000)	ELISA	2014	(Knuuttila, 2015)
Estonia	22 (51)	PCR	2007-2010	(Leimann <i>et al.</i> , 2015)
China	48-67	CIEP	2005	(Li <i>et al.</i> , 2012)
España	0 (81.000) 11 <sup>a</sup> (37)	CIEP	2011	AGAVI y datos propios propios no publicados
España	0,04 (72.000) 22 <sup>a</sup> (36)	CIEP	2019	AGAVI y datos propios propios no publicados

a. Porcentaje de granjas positivas (sobre el total de analizadas).

CIEP: contrainmunolectroforesis; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; ELISA: ensayo inmunosorbente ligado a enzimas.

#### 1.4.2. Rango de hospedadores

Los síntomas clínicos y lesiones características de la AD se dan sobre todo en visón americano, tanto de granja como silvestre; sin embargo, existen otras especies que pueden desarrollar AD, como son el hurón (*Mustela putorius furo*) y la mofeta rayada (*Mephitis mephitis*) (Porter *et al.*, 1982; LaDouceur *et al.*, 2015). En la tabla 9 se puede consultar más información y referencias acerca de éstas y otras especies en las que ha sido descrito el AMDV.

**En hurones**, la infección persistente por AMDV fue descrita ya en 1966 por Kenyon *et al.*, resaltando la ausencia de enfermedad clínica y menor gravedad de las lesiones. En aquellos animales que presentaban HGG se observaron infiltrados linfoplasmocíticos en hígado y riñón, así como hipertrofia del timo en algunos de los animales (Kenyon *et al.*, 1966a, 1966b). En cuanto a las lesiones glomerulares en el hurón, éstas son mínimas o inexistentes, y tampoco desarrolla arteritis ni presenta apenas sintomatología clínica (Ohshima *et al.*, 1978). Más recientemente sí se han descrito signos clínicos más severos en hurones infectados, que comprenden un síndrome de desmedre crónico y enfermedad neurológica que se manifiesta con ataxia o paresia/parálisis posteriores (Welchman *et al.*, 1993; Deeney, 2002). Aunque tanto las cepas de AMDV de hurón como de visón se replican y persisten en el

hurón, no causan una enfermedad de la gravedad que generalmente se observa en el visón, y los títulos de anticuerpos son mucho más bajos. De manera similar, las cepas de AMDV de hurón no causan HGG ni lesiones en el visón (ni siquiera en los genotipos aleutianos), aunque sí desarrolla anticuerpos frente al virus (Porter *et al.*, 1982). Las diferencias entre las cepas de AMDV de hurón y de visón también se manifiestan a nivel genético; por ejemplo, se han descrito homologías de la región hipervariable de una cepa de hurón del 64, 54 y 59% comparada con la de las cepas AMDV-G, Utah-1 y K, respectivamente (Saifuddin y Fox, 1996). Murakami *et al.*, (2001) encontraron una homología del 96% en un fragmento de 365 nt del gen de las proteínas capsulares respecto a otras cepas de hurón, mientras que esta homología era inferior al 91% con respecto a las cepas de visón. Por tanto, las cepas de AMDV de visón y hurón parecen ser biológicamente distintas (Daoust y Hunter, 1978; Porter *et al.*, 1982; Canuti *et al.*, 2015) y genéticamente divergentes (Murakami *et al.*, 2001).

La enfermedad en la **mofeta rayada** ha sido descrita en USA y Canadá, caracterizándose por alteraciones neurológicas, como aumento de la actividad diurna, depresión mental, docilidad, ataxia y/o convulsiones (LaDouceur *et al.*, 2015). Las lesiones encontradas incluyeron inflamación multisistémica linfoplasmocítica (nefritis intersticial, miocarditis, hepatitis, meningoencefalitis, neumonía y esplenitis), glomerulonefritis, arteritis con o sin necrosis fibrinoide en varios órganos (riñón, corazón, cerebro y bazo), esplenomegalia, ascitis/hidrotórax y/o encefalomalacia con microangiopatía cerebral (LaDouceur *et al.*, 2015; Britton *et al.*, 2017; Glueckert *et al.*, 2019). Canuti *et al.* (2017) demostraron que el amdoparvovirus detectado en mofeta rayada con infecciones tanto clínicas como subclínicas es lo suficientemente divergente como para ser considerado una especie diferente, capaz de infectar también a visones y, al igual que el AMDV, tiende a establecer infecciones subclínicas y presenta un alto grado de diversidad genética. Este amdoparvovirus ha sido reconocido recientemente como nueva especie por el ICTV (2018b) y denominada *Carnivore amdoparvovirus 4* (SKAV: Skunk amdoparvovirus). Muchos de los casos reportados como infección por AMDV en mofeta rayada en base a la serología pueden en realidad corresponder a infecciones por el SKAV (Canuti *et al.*, 2017).

En España, la infección por AMDV es endémica en las poblaciones silvestres tanto de visón americano como visón europeo, sin que se hayan observado efectos adversos sobre dichas poblaciones (Mañas *et al.*, 2016). Aunque se han detectado HGG (> 20%) y ligeras lesiones inflamatorias multisistémicas compatibles con la AD en visones europeos infectados, no se ha detectado ningún efecto negativo obvio sobre dichos animales (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004; Mañas, 2015). Sin embargo, el hecho de que el porcentaje de animales con serología positiva que muestran HGG sea similar en ambas especies en vida silvestre, es interpretado por los autores como indicio de que el potencial patogénico del AMDV sobre el visón europeo podría ser similar (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004). Si el visón europeo padece o no la enfermedad, así como las características que ésta podría adoptar en esta especie y su efecto real sobre sus poblaciones es un tema que requiere de nuevos estudios (Mañas, 2015). La única cepa publicada sobre un fragmento del genoma del AMDV aislado a

partir de visón europeo silvestre difiere notablemente de las demás cepas de AMDV descritas en GenBank (Mañas *et al.*, 2001).

También se han encontrado anticuerpos anti-AMDV en **humanos**, pero sólo excepcionalmente se ha descrito sintomatología clínica o lesiones compatibles con la enfermedad (Porter y Larsen, 1974; Gorham *et al.*, 1976; McGuire y Crawford, 1980; Jepsen *et al.*, 2009). Uno de estos estudios describió la presencia de anticuerpos y ADN del AMDV en dos granjeros de visón, uno con arteritis y otro con glomerulonefritis crónica (Jepsen *et al.*, 2009); además, se describieron con anterioridad otros dos casos sospechosos (Chapman y Jimenez, 1963; Helmbolt *et al.*, 1965). En un estudio serológico realizado sobre trabajadores de laboratorio, se encontraron anticuerpos en 5 de 18 trabajadores en contacto con fuentes concentradas del virus, en 0 de 17 trabajadores en contacto con tejidos infectados, y también en 12 de 225 pacientes hospitalarios sin contacto conocido con el AMDV (McGuire y Crawford, 1980). La infección experimental de visón de genotipo aleutiano con sangre de 4 de los trabajadores de laboratorio con serología positiva y asintomáticos no causó lesiones ni el desarrollo de anticuerpos frente al AMDV, pese a que en uno de estos trabajadores los anticuerpos persistieron durante 18 meses. Respecto a los pacientes hospitalarios, se concluyó que se trataba de reacciones cruzadas con otros parvovirus.

**Experimentalmente**, el AMDV se ha inoculado en varias especies: hurones (*Mustela putorius furo*), armiños (*Mustela erminea*), marta pescadora (*Pekania pennanti*), marta americana (*Martes americana*), mofeta rayada (*Mephitis mephitis*), perro mapache (*Nyctereutes procyonoides*), mapache boreal (*Procyon lotor*), gatos (*Felis silvestris catus*), perros (*Canis lupus familiaris*), zorros azules (*Vulpes lagopus*), ratones y conejos, desarrollando anticuerpos todos ellos después de la inoculación pero con títulos más bajos que el visón; sólo hurones y mofetas rayadas desarrollaron lesiones histológicas similares a la AD en visón (Kenyon *et al.*, 1978; Porter *et al.*, 1982; Haagsma, 1984; Alexandersen *et al.*, 1985b; Oie *et al.*, 1996). También se ha descrito evidencia de replicación viral en hurones, mapaches, mofeta rayada, perros mapaches y perros (Kenyon *et al.*, 1978; Porter *et al.*, 1982; Haagsma, 1984; Alexandersen *et al.*, 1985b; Oie *et al.*, 1996); además, los ratones y los gatos albergaban virus infecciosos en sus tejidos (Alexandersen *et al.*, 1985b). En tanto que el perro mapache y el mapache boreal deben ser considerados amenazas potenciales como transmisores del virus, otras especies como los gatos, perros, ratones, mofetas rayadas y hurones pueden ser considerados reservorios potenciales, mientras que el zorro azul y el conejo no parecen constituir riesgo alguno de transmisión (Haagsma, 1984; Alexandersen *et al.*, 1985b; Oie *et al.*, 1996; Canuti *et al.*, 2017).

**Tabla 9. Prevalencia y descripción de la infección natural por el AMDV en diferentes especies animales y seres humanos (adaptado de Knuuttila, 2015).**

AC% <sup>a</sup>	ADN% <sup>a</sup>	Año	País	Método	Lesiones	Referencia
<b>Visión americano silvestre/American mink (<i>Neovison vison</i>)</b>						
93 (60)	88 (60)	2009-2011	Canadá	CIEP, PCR	ND	(Farid, 2013)
29 (208)	25 (183)	2005-2009	Canadá	CIEP, PCR	ND	(Nituch <i>et al.</i> , 2011, 2012)
55 (55)	ND	Principios 1970s	Canadá	CIEP, HP	Lesiones histológicas típicas de AD (6/55)	(Cho y Greenfield, 1978)
55 (29)	ND	Principios 1970s	Canadá	ND	ND	(Ingram y Cho, 1974)
46 (144)	58 (144)	2004-2009	Suecia	ELISA, PCR	Lesiones macroscópicas típicas de AD (6/144)	(Persson <i>et al.</i> , 2015)
3-45 (538)	0-32 (57)	1998-2009	Dinamarca	CIEP, PCR	ND	(Jensen <i>et al.</i> , 2012)
23 (75)	ND	1996-2002	Francia	CIEP, CCLAI	Mala condición física (2/5)	(Fournier-Chambrillon <i>et al.</i> , 2004)
52 (27)	ND	Finales 1990s	Inglaterra	CIEP	ND	(Yamaguchi y Macdonald, 2001)
ND	15 (27)	2007-2010	Estonia	PCR	ND	(Leimann <i>et al.</i> , 2015)
0 (16)	40 (5)	1997-1999	España	CIEP, PCR, HP	Lesiones histológicas típicas de AD (1/5)	(Mañas <i>et al.</i> , 2001)
32,4 (1735)		1997-2012	España	CIEP		(Mañas <i>et al.</i> , 2016)
<b>Visión europeo/European mink (<i>Mustela lutreola</i>)</b>						
0 (84)	ND	2004-2005	España	CIEP	ND	(Sánchez-Migallón Guzmán <i>et al.</i> , 2008)
12 (99)	ND	1996-2002	Francia	CIEP, CCLAI	Mala condición física (3/14)	(Fournier-Chambrillon <i>et al.</i> , 2004)
33 (9)	1/1 <sub>b</sub>	1997-1999	España	CIEP, PCR, HP	Sin lesiones (0/1)	(Mañas <i>et al.</i> , 2001)
32 (245)		1997-2012	España	CIEP		(Mañas <i>et al.</i> , 2001)
ND	0 (4)	2007-2010	Estonia	PCR	ND	(Leimann <i>et al.</i> , 2015)

Tabla 9. Continuación (1).

AC% <sup>a</sup>	ADN% <sup>a</sup>	Año	País	Método	Lesiones	Referencia
<b>Mofeta rayada/Striped skunk (<i>Mephitis mephitis</i>)</b>						
ND	64,8 (216) <sub>c</sub>	2004-2016	USA	PCR, necropsia, HP	Neumonía intersticial, lesiones inflamatorias en diversos órganos	(Glueckert <i>et al.</i> , 2019)
ND	86 (50) <sub>d</sub>	2011-2015	Canadá	PCR, necropsia, HP	Glomerulonefritis (2/43)	(Britton <i>et al.</i> , 2017; Canuti <i>et al.</i> , 2017)
ND	7 (27)	2010-2013	USA	PCR, ISH, necropsia, HP	Lesiones macroscópicas e histológicas de leves a graves similares al visón AD (7/27)	(LaDouceur <i>et al.</i> , 2015)
18 (22)	14 (22)	1990s	USA	CIEP, PCR	ND	(Oie <i>et al.</i> , 1996)
25 (8)	13 (8)	2009-2011	Canadá	CIEP, PCR	ND	(Farid, 2013)
41 (347)	32 (40)	2006-2008	Canadá	CIEP, PCR	ND	(Nituch <i>et al.</i> , 2015)
65 (196)	ND	Early 1970s	Canadá	ND	ND	(Ingram y Cho, 1974)
4 (27)	ND	Principios 1970s	Canadá	ND	ND	(Ingram y Cho, 1974)
<b>Hurón/Ferret (<i>Mustela putorius furo</i>)</b>						
9 (446)	ND	1990-1991	Inglaterra	CIEP	ND	(Welchman <i>et al.</i> , 1993)
42 (214)	ND	Finales 1970s-inicios 1980s	USA	IF	ND	(Porter <i>et al.</i> , 1982)
<b>Turón europeo/Polecat (<i>Mustela putorius</i>)</b>						
11 (145)	ND	1996-2002	Francia	CIEP, CCLAI	ND	(Fournier-Chambrillon <i>et al.</i> , 2004)
ND	0 (42)	2007-2010	Estonia	PCR	ND	(Leimann <i>et al.</i> , 2015)
0 (18)	ND	1970s	USA	CIEP	ND	(Bloom <i>et al.</i> , 1975)



Tabla 9. Continuación (2).

AC% <sup>a</sup>	ADN% <sup>a</sup>	Año	País	Método	Lesiones	Referencia
<b>Mapache/Raccoon (<i>Procyon lotor</i>)</b>						
11 (85)	11 (85)	2009-2011	Canadá	CIEP, PCR	ND	(Farid, 2013)
4 (27)	ND	Principios 1970s	Canadá	ND	ND	(Ingram and Cho, 1974)
<b>Perro mapache/Raccoon dog/Finn raccoon (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)</b>						
ND	0 (23)	2007-2010	Estonia	PCR	ND	(Leimann <i>et al.</i> , 2015)
<b>Tejón/Badger (<i>Meles meles</i>)</b>						
ND	0 (4)	2007-2010	Estonia	PCR	ND	(Leimann <i>et al.</i> , 2015)
<b>Garduña/Stone marten (<i>Martes foina</i>)</b>						
24 (17)	ND	1996-2002	Francia	CIEP, CCLAI	ND	(Fournier-Chambrillon <i>et al.</i> , 2004)
ND	0 (1)	2007-2010	Estonia	PCR	ND	(Leimann <i>et al.</i> , 2015)
<b>Marta/Pine marten (<i>Martes martes</i>)</b>						
6 (16)	ND	1996-2002	Francia	CIEP, CCLAI		(Fournier-Chambrillon <i>et al.</i> , 2004)
ND	0 (49)	2007-2010	Estonia	PCR	ND	(Leimann <i>et al.</i> , 2015)
<b>Gineta/Common genet (<i>Genetta genetta</i>)</b>						
4 (68)	ND	1996-2002	Francia	CIEP, CCLAI	ND	(Fournier-Chambrillon <i>et al.</i> , 2004)
<b>Nutria de río americana/River otter (<i>Lontra canadensis</i>)</b>						
0 (59)	0 (59)	2011-2012	Canadá	CIEP, qPCR	ND	(Bowman <i>et al.</i> , 2014)
18 (11)	18 (11)	2009-2011	Canadá	CIEP, PCR	ND	(Farid, 2013)
<b>Nutria europea (<i>Lutra lutra</i>)</b>						
ND	1/1 <sub>b</sub>	Inicios 2000s	España	PCR, necropsia, HP	Sin lesiones	(Mañas <i>et al.</i> , 2001)
ND	0 (2)	2007-2010		ND	ND	(Leimann <i>et al.</i> , 2015)
<b>Armiño/Stoat (<i>Mustela erminea</i>)</b>						
70 (61)	70 (61)	2009-2011	Canadá	CIEP, PCR	ND	(Farid, 2013)

Tabla 9. Continuación (3).

AC% <sup>a</sup>	ADN% <sup>a</sup>	Año	País	Método	Lesiones	Referencia
<b>Gato montés/Bobcat (<i>Lynx rufus</i>)</b>						
10 (20)	10 (20)	2009-2011	Canadá	CIEP, PCR	ND	(Farid, 2013)
<b>Coyote/Coyote (<i>Canis latrans</i>)</b>						
0 (24)	0 (24)	2009-2011	Canadá	CIEP PCR	ND	(Farid, 2013)
<b>Marta pescadora/Fisher (<i>Pekania pennanti</i>)</b>						
0 (6)	0 (6)	2009-2011	Canadá	CIEP PCR	ND	(Farid, 2013)
<b>Zorro</b>						
2 (100)	ND	Principios 1970s	Canadá	ND	ND	(Ingram y Cho, 1974)
<b>Zorro rojo/Red Fox (<i>Vulpes vulpes</i>)</b>						
0 (25)	0 (25)	2009-2011	Canadá	CIEP PCR	ND	(Farid, 2013)
<b>Ardilla roja/Red squirrel (<i>Sciurus vulgaris</i>)</b>						
0 (45)	0 (45)	2009-2011	Canadá	CIEP PCR	ND	(Farid, 2013)
<b>Rata almizclera/Muskrat (<i>Ondatra zibethicus</i>)</b>						
0 (59)	0 (59)	2009-2011	Canadá	CIEP PCR	ND	(Farid, 2013)
<b>Castor/Beaver (<i>Castor spp.</i>)</b>						
0 (58)	0 (58)	2009-2011	Canadá	CIEP PCR	ND	(Farid, 2013)
<b>Seres humanos</b>						
2/2 <sub>b</sub>	ND	1990s-2000s	Dinamarca	CIEP, CCLAI, PCR, necropsia, HP	Arteritis (1/2), glomerulonefritis (1/2)	(Jepsen <i>et al.</i> , 2009)
7 (243)	ND	Finales 1970s	USA	CIEP, FC	ND	(McGuire y Crawford, 1980)

a. Porcentaje de individuos con anticuerpos (AC) o ADN vírico (entre paréntesis, número de individuos evaluados).

b. Número de individuos positivos/número de individuos evaluados.

c. Género *Amdoparvovirus*, especie no confirmada.

d. SKAV, Skunk amdoparvovirus (*Carnivore amdoparvovirus 4*, {ICTV, 2018}).

**Abreviaturas:** AC, anticuerpo; AD, enfermedad de Aleutiana; CIEP, inmunoelectroforesis a contracorriente; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; ELISA, ensayo inmunosorbente ligado a enzimas; HP, histopatología; ND, sin datos; ISH, hibridación in situ; IF, inmunofluorescencia; CCLAI, inmunoelectroforesis a contracorriente en línea de absorción; qPCR, PCR cuantitativa en tiempo real; FC, fijación del complemento.

### 1.4.3. Vías de transmisión

El AMDV se transmite por vía vertical y horizontal, tanto de forma directa como indirecta. Su capacidad de establecer infecciones persistentes y asintomáticas, la ausencia de inmunidad efectiva y su extrema resistencia ambiental facilitan el contagio, así como la aparición de nuevas infecciones en granjas “vírgenes” o la reintroducción de la infección en

granjas donde ha sido previamente erradicado. La compra de animales infectados, material de granja contaminado y el movimiento de personas y fauna silvestre entre granjas infectadas son también factores importantes en su epidemiología, la cual se ve notablemente afectada por la cepa infectante y por el genotipo del visón (aleutianos vs no aleutianos). La transmisión vertical es la principal vía de contagio con cepas de baja o mediana virulencia/infecciosidad y en genotipos no aleutianos, mientras que en el caso de cepas de alta virulencia/infecciosidad y/o genotipos aleutianos la vía horizontal es seguramente importante, aunque el mecanismo implicado está aún por esclarecer.

#### 1.4.3.1. La transmisión vertical

La transmisión intrauterina fue demostrada en varios trabajos experimentales, tanto en infecciones crónicas como agudas, habiéndose demostrado la presencia de virus en placenta y la mayoría de tejidos fetales (Henson *et al.*, 1963a; Padgett *et al.*, 1967; Haagsma, 1969; Haagsma y Bokhout, 1980; Aasted, 1985; Broll y Alexandersen, 1996). Aunque algunos intentos de transmitir la enfermedad a partir de la leche de madres infectadas fracasaron (Gorham *et al.*, 1964), el virus ha sido detectado en la glándula mamaria (Broll y Alexandersen, 1996) así como en leche en una madre hacia el final de la lactación (Haagsma y Bokhout, 1980), por lo que la transmisión por esta vía se considera posible.

La transmisión vertical es considerada como la vía principal de infección del AMDV, de forma que la mayor parte de la descendencia de madres infectadas son CIEP positivas en la siguiente campaña de peletización (Cho y Greenfield, 1978; Hansen, 1980, 1985; Farid, 2018); de ello se concluye que la transmisión vertical es fundamental para mantener la infección en una población de visones, tanto en granja como en vida silvestre (Cho y Greenfield, 1978). Sin embargo, estudios epidemiológicos en Holanda demostraron que alrededor de un 24% de la descendencia de madres CIEP(+)/IAT(-)<sup>5</sup> se mantuvieron libres de infección y pudieron incorporarse a poblaciones negativas sin transmitir el virus a su descendencia al año siguiente (Haagsma y Bokhout, 1980). Se ha observado que cuando la infección es trasplacentaria se desarrolla una forma más benigna (o más lenta) de la enfermedad al tiempo que unos mayores títulos infecciosos, por lo que esta vía de contagio favorecería la supervivencia del virus (Porter *et al.*, 1977b): los visones con enfermedad no progresiva viven lo suficiente para transmitir el virus por vía horizontal a visones no infectados y, más importante, por vía vertical a la siguiente generación (Gorham *et al.*, 1976; Cho y Greenfield, 1978). Sin embargo, en algunas granjas el progreso de la infección es muy rápido, lo que sugiere que con cepas de alta infecciosidad/virulencia las vías predominantes de transmisión pueden ser otras (Cho y Greenfield, 1978).

<sup>5</sup> Los animales negativos al test de yodo (IAT) son de algún modo tolerantes a la infección o resistentes a la enfermedad.

#### 1.4.3.2. La transmisión horizontal

##### 1.4.3.2.1. Vías de eliminación, periodo infectivo y carga ambiental

Todos los fluidos corporales (**sangre, suero, saliva, heces y orina**) pueden contener virus y transmitir la infección directa o indirectamente (alimento contaminado, agua o ambiente) (Kenyon *et al.*, 1963; Gorham *et al.*, 1964, 1976; Haagsma y Bokhout, 1980; Haagsma, 1984; Cepica y Iwamoto, 2012; Jensen *et al.*, 2014; Farid *et al.*, 2015). Trabajos realizados en Holanda demostraron que la presencia del virus en heces y saliva es detectable ya a los 15 dpi y se mantiene continua durante toda la vida del animal; no obstante, la concentración (valorada como  $DI_{50}$ : Haagsma y Bokhout, 1980; o  $DL_{50}$ : Haagsma, 1984) era oscilante, con valores entre  $10^1$  y  $10^4$  en heces y entre  $10^0$  y  $10^3$  en saliva dependiendo de la virulencia de la cepa, dosis infectante y genotipo del visón. Estos trabajos coinciden sólo parcialmente con estudios más recientes basados en la detección del ADN vírico mediante PCR convencional, en los cuales se ha encontrado que la presencia del virus en estos fluidos es intermitente y depende de factores como dosis infectiva, momento post-infección y vía de inoculación (Jensen *et al.*, 2014; Farid *et al.*, 2015; Farid y Hussain, 2019). Así, por ejemplo, trabajando con una cepa de campo de virulencia media se ha detectado una eliminación intermitente del virus en heces y saliva, habiéndose encontrado una eliminación creciente (porcentaje de muestras de saliva, recto y heces positivas a PCR) hasta el día 36 pi para posteriormente declinar hacia el día 56 pi (Farid y Hussain, 2019). Jensen *et al.* (2014) trabajaron con la cepa prevalente en granjas danesas (cepa Saeby/DEN/799.1/05, de mediana virulencia) a dosis infectivas ajustadas para establecer una infección crónica, y encontraron que la eliminación en heces era detectable en todos animales, de forma continua o discontinua, entre las 2 y las 8 spi, haciéndose luego intermitente o indetectable; sin embargo, la eliminación en hisopos oro-nasales se produjo sólo en 21 de 29 animales y limitada a un periodo variable entre las 2 y 10 spi, además durante periodos de tiempo más breves que la eliminación fecal, haciéndose luego indetectable hasta el final de la prueba (figura 11).

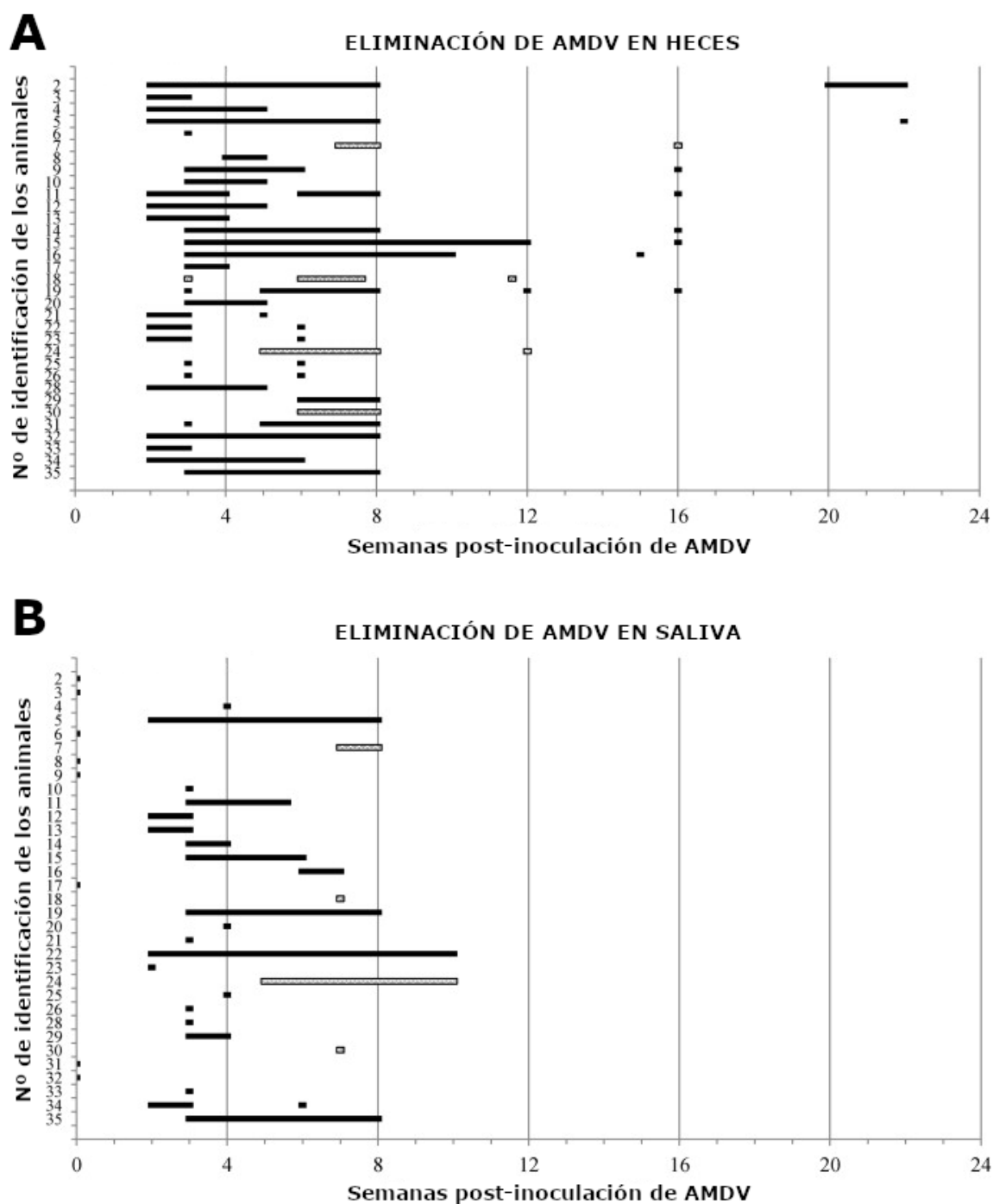


Figura 11. Excreción de AMDV tras la infección experimental. A) heces y B) saliva. Barras negras: visión wild, infección experimental. Barras grises: visión zafiro (aa), animales centinela (adaptado de Jensen *et al.*, 2014, con permiso de Elsevier).

Bloom *et al.* (1987) estimaron la  $DI_{50}$  en 100 genomas para la cepa Utah-1 en visones aleutianos infectados experimentalmente por vía intraperitoneal. La carga vírica en el suero bajo esas condiciones experimentales se estimó en  $10^6$   $DI_{50}$ /ml de suero a los 10 dpi, cuando

los niveles de anticuerpos son todavía muy bajos, y de  $10^4$  DI<sub>50</sub>/ml de suero a los 60 dpi, cuando el nivel de anticuerpos es muy alto y la enfermedad mediada por IC es muy evidente.

La determinación del **periodo infectivo** aún hoy es un tema abierto, en el que las consideraciones de Gorham *et al.* realizadas en 1976 siguen teniendo vigencia: los visones de genotipo aleutiano son infectivos de por vida, mientras que en los demás genotipos probablemente depende del curso de la infección (Gorham *et al.*, 1976).

La **carga ambiental** en granjas infectadas viene asegurada por las vías de eliminación del virus, su concentración en dichos fluidos, así como por su alta resistencia ambiental (Gorham *et al.*, 1976; Haagsma y Bokhout, 1980), donde el virus permanece estable en el terreno y el ambiente de la granja durante años (Hansen, 1988). Se ha detectado, por ejemplo, una viremia promedio de dos unidades logarítmicas más alta en una granja con infección clínica respecto a otra con infección subclínica; así, una mayor cantidad de material genético del virus indica una tasa de replicación más rápida, que puede ser tanto una causa como un efecto de una forma específica de la enfermedad (Kowalczyk *et al.*, 2018), pero que en cualquier caso podría verse reflejado en la carga ambiental. Además de en la presente tesis doctoral, la presencia de virus en el entorno de granja ha sido posteriormente documentada en Polonia, tanto en muestras en contacto directo como indirecto con los animales (Kowalczyk *et al.*, 2019a). Así mismo se ha demostrado la presencia de virus en filtrados de aire en granjas infectadas (De Geus *et al.*, 1996; datos propios no publicados). No obstante, la determinación de las cargas ambientales del virus, su relación con el curso de la enfermedad y su repercusión epidemiológica no han sido suficientemente estudiadas.

#### 1.4.3.2.2. *Trasmisión horizontal directa*

Se ha demostrado la infección experimental por **inoculación subcutánea** (Gorham *et al.*, 1964; Haagsma y Bokhout, 1980; Haagsma, 1984), por **vía oral** (Gorham *et al.*, 1964, 1976; Haagsma y Bokhout, 1980; Farid y Hussain, 2019) e **intranasal** (Farid y Hussain, 2019).

La **vía saliva-mordedura** ha sido propuesta en base a la presencia del virus en saliva y la confirmación de la infección experimental por vía subcutánea (Haagsma y Bokhout, 1980; Haagsma, 1984); esta vía es posible no sólo en apareamientos, sino también en las camadas antes de la separación y durante el periodo de crecimiento, cuando los visones están alojados en grupos de dos o más individuos. En relación con la transmisión durante el coito, la infección durante los apareamientos parece producirse fundamentalmente de los machos a las hembras. Según la literatura previa, el macho puede infectar a la hembra con facilidad a través la de saliva contaminada al sujetarlas por la nuca, mientras que la transmisión de la hembra al macho durante el coito parece mucho menos frecuente (Haagsma, 1969; Gorham *et al.*, 1976; Aasted y Hauch, 1988).

La **vía saliva-aerosol respiratoria** es también posible en la medida que el virus está presente en saliva, pero algunos autores la consideran secundaria en las condiciones reales de granja (Haagsma, 1969; Gorham *et al.*, 1976); se ha demostrado que la tasa de transmisión es alta cuando los animales comparten jaula, pero disminuye a medida que aumenta la distancia entre jaulas, así como también entre jaulas enfrentadas a ambos lados del pasillo (Hansen,



1985). Experimentalmente, la inoculación intranasal es más eficaz en animales previamente sedados, lo que sugiere una dependencia de la dosis ya que parte del inóculo intranasal en animales no sedados se pierde (Farid y Hussain, 2019).

#### 1.4.3.2.3. *Trasmisión horizontal indirecta*

Con respecto a **la vía fecal-oral**, las jaulas, nidos, bebederos, sobras de pienso, guantes de sujeción, jaulas de transporte y otros elementos en contacto con los animales se contaminan mediante la eliminación del virus en saliva, heces y orina (Hansen, 1985). Por tanto, esta vía es seguramente importante, pero requiere de una alta dosis de virus o de un tiempo de exposición prolongado, al menos con cepas de baja virulencia como la Pullman (Gorham *et al.*, 1964, 1976). La infección a partir de pienso contaminado depende notablemente de la virulencia de la cepa, requiriéndose dosis 100 veces menores con una cepa de alta respecto a otra de baja virulencia:  $10^2$  frente a  $10^4$  DL<sub>50</sub> (visón, ip) (Haagsma, 1984). No obstante, en Dinamarca se ha descrito un brote de AD en el año 2002 asociado a una fábrica de pienso, y se pudo demostrar que el virus aislado del pienso era la misma cepa que la detectada en los animales de las granjas afectadas (Espregueira Themudo *et al.*, 2011). De manera similar, un nuevo brote en Dinamarca en 2015 se asoció también a varias fábricas de pienso (Ryt-Hansen *et al.*, 2017).

La infección experimental por **vía aerógena** con dosis altas, cepas de diversa virulencia (Pullman, Guelph y Utah-1) y con confinamiento de los animales ha sido demostrada por algunos autores (Gorham *et al.*, 1964; Jericho, 1982; De Geus *et al.*, 1996) o inferidas a partir de evidencias epidemiológicas (Hansen, 1980, 1988). La forma aguda de la enfermedad en crías recién nacidas (neumonía intersticial) ha sido también reproducida experimentalmente por vía aerógena (Alexandersen, 1986). Sin embargo, la transmisión natural entre granjas por esta vía no ha podido ser confirmada, ni aún en los casos de granjas con brotes agudos de neumonía intersticial (Hadlow *et al.*, 1983; Jackson *et al.*, 1996; Chriél, 2000; Jensen *et al.*, 2014). Hansen (1988) considera que 300 m de separación entre granjas no garantiza protección frente a la transmisión aerógena, pero sí una distancia de 2 km. En el trabajo de De Geus *et al.* (1996) se realizó el filtrado de 1.875 m<sup>3</sup> de aire en una nave cerrada con una prevalencia al CIEP del 80% a tres alturas diferentes sobre el nivel del suelo (0,2, 0,75 y 1,75 m), y posteriormente se observó un retraso en la seroconversión en los animales inoculados por vía IP con el filtrado de aire a 1,75 m (alrededor de 9 spi contra 5 spi o menos para las otras dos alturas); de estos resultados los autores infieren que el virus en las granjas está seguramente asociado a partículas de tamaño relativamente grande que tienden a sedimentar. Jericho, (1982) comparó las lesiones pulmonares en camadas completas (madre y sus crías) infectados experimentalmente por vía aerógena (entre el 16 y 23 día de lactación) frente a animales con infección natural, y observó una hiperplasia del tejido linfoide pulmonar y bronquial, así como la frecuente infiltración del epitelio respiratorio por células mononucleares a partir de los 42 dpi en los animales infectados por vía aerógena (madres y crías) pero no en los casos de infección natural; de todo ello el autor concluye que dichas lesiones, diferentes de las descritas en pulmón para la forma progresiva de la enfermedad, podrían ser un rasgo asociado a la infección experimental mediante aerosol por dicha vía. Con

todo, se han descrito lesiones similares en la forma progresiva de la enfermedad desarrollada por las crías infectadas al nacer y que superan la fase de neumonía intersticial (Alexandersen et al., 1994a).

La **vía iatrogénica** también ha sido descrita en la infección por AMDV, ya que la presencia de virus en sangre y suero, aun siendo intermitente, hace posible la transmisión por esta vía al utilizar por ejemplo agujas contaminadas (Hansen, 1988); no obstante, algunos autores encontraron que la enfermedad no se transmitía de este modo, seguramente debido a que la dosis de virus era demasiado baja para producir infección (revisado por Gorham *et al.*, 1976). La manipulación de los animales necesaria para la extracción de sangre conlleva la contaminación del cortaúñas, guantes y vestimenta de los operarios, lo que siempre entraña un riesgo de transmisión (Cho y Greenfield, 1978; Jackson *et al.*, 1996).

La **transmisión por artrópodos** ha sido abordada por diversos autores. Aunque las pulgas son una plaga frecuente en las granjas de visón y no han sido consideradas como vehículo de transmisión en algunos trabajos (Gorham *et al.*, 1964; Haagsma, 1969), recientes estudios daneses han demostrado la transmisión experimental del AMDV a través de estos insectos (pulga de la ardilla, *Ceratophyllus sciurorum*). El virus fue detectado en las pulgas a los tres días de infestar visones infectados experimentalmente tres semanas antes; además, estas pulgas fueron capaces de transmitir el virus a visones no infectados, si bien no se pudo detectar ADN vírico en las pulgas tres semanas más tarde (Hartby *et al.*, 2015). Los autores señalan que aves, gatos, ratones y humanos pueden ser hospedadores de esta misma especie de pulga y, por tanto, actuar de vectores de la enfermedad entre granjas. El mosquito *Aedes fitchii* es capaz de mantener virus infectivo durante al menos 35 días, pero no el mosquito *Aedes aegypti*; sin embargo, los autores no pudieron demostrar la transmisión natural por esta vía (Shen et al., 1973). Gorham *et al.* (1976) tampoco consideran que los artrópodos hematófagos sean importantes en la transmisión del AMDV. En cuanto a las moscas, éstas son una plaga frecuente en las granjas de visón y es lógico suponer que su contacto con heces, orina y pienso puede convertirlas en vector de la enfermedad; sin embargo, Shen y Gorham (1973) no pudieron demostrar la transmisión del AMDV a través de dos especies de mosca frecuentes en las granjas de Norteamérica, la *Phormia regina* y la *Musca domestica*. Recientemente Prieto *et al.* (2018) han demostrado la presencia del AMDV en ejemplares de mosca doméstica menor (*Fannia canicularis*) capturados en granjas con infección endémica, sugiriendo su posible papel como vector de la enfermedad.

#### 1.4.3.2.4. La importancia de la vía horizontal

Pese a la contaminación ambiental de las granjas infectadas (Haagsma, 1984; De Geus *et al.*, 1996; Kowalczyk *et al.*, 2019), a menudo animales no infectados han estado alojados con o cerca de animales infectados sin que se transmitiera la enfermedad; así, esta lenta propagación sugiere la existencia de una dosis umbral para la infección de visones susceptibles (Gorham *et al.*, 1976; Cho y Greenfield, 1978). Cho y Greenfield (1978) describieron que en 42 de 58 jaulas con parejas de visones azules testados en el mes de noviembre únicamente uno de los ocupantes de cada jaula era CIEP positivo, y sólo en las otras 16 jaulas fueron positivos ambos animales; no obstante, hay muchas evidencias de que

las jaulas y nidos que han alojado animales positivos transmiten la enfermedad (Haagsma, 1969; Gorham *et al.*, 1976; Hansen, 1985). Las posibilidades de transmisión horizontal disminuyen al aumentar la distancia entre los animales, aunque el virus puede transmitirse por vía aerógena hasta a 100 m de distancia (Hansen, 1980, 1985). En su revisión sobre la epizootiología de la enfermedad, Gorham cita trabajos de Larsen (1966) donde se produjo la transmisión de la enfermedad a través de guantes contaminados con extractos de bazo/riñón infectados, mientras que Haagsma (comunicación personal) no logró transmitir la enfermedad por esta vía (revisado por Gorham *et al.*, 1976).

Otra consideración a tener en cuenta es que, cuando un patógeno entra en un nicho ecológico con alta densidad de población y sin protección inmunológica (tal como puede ser una granja), a menudo se replica y se propaga rápidamente provocando graves brotes epizooticos que resultan desfavorables tanto para el huésped como para el patógeno, bien directamente por la mortalidad que provoca, o bien indirectamente por las acciones emprendidas por el granjero, tales como la despoblación y posterior desinfección de la explotación o la selección de animales que muestran una mayor resistencia a la enfermedad (Kowalczyk *et al.*, 2018). Los brotes epizooticos fulminantes de alta infecciosidad y virulencia en visones no aleutianos son raros pero aparecen con cierta frecuencia, lo que es seguramente debido a cepas de mayor virulencia/infecciosidad que las habituales (Gorham *et al.*, 1976; Oie *et al.*, 1996; Xi *et al.*, 2016); algunas de estas cepas, como la TR (Oie *et al.*, 1996) y la BJ (Li *et al.*, 2012), han sido descritas a nivel molecular sin que se haya aclarado suficientemente cuáles son los determinantes que explican dichas características. Se sabe que las cepas de alta virulencia, como la Utah-1 y Ontario, se replican antes y alcanza títulos más altos; en qué medida estas diferencias tienen alguna relación con la infecciosidad y transmisibilidad del AMDV en condiciones naturales es algo que aún tiene que ser demostrado (Hadlow *et al.*, 1983).

También debe destacarse que las dinámicas poblacionales influyen en la diversificación y evolución vírica. Así, las altas densidades de población que se alcanzan en las granjas de visón en condiciones de cría intensiva y el corto ciclo de vida de los hospedadores favorecen la transmisión vírica al facilitarse tanto el contacto directo entre animales como la incorporación anual (partos) de nuevos individuos susceptibles. Ambos factores influyen en la eficiencia de propagación del virus en términos de incremento de la  $R_0$  (número promedio de infecciones secundarias a partir de un solo huésped infectado). Es necesaria una  $R_0 > 1$  para que la infección se mantenga en el tiempo. En estas condiciones de manejo se favorece una tasa de multiplicación más rápida (es decir, un tiempo de generación más corto), y por lo tanto una diversificación más rápida. La alta resistencia ambiental del AMDV y su tendencia a causar infecciones persistentes son también factores que favorecen el contagio y las coinfecciones, las cuales favorecen a su vez la recombinación entre cepas diferentes (revisado por Canuti *et al.*, 2016).

Por otro lado, la cría en granjas de cabañas infectadas por el ADMV ejerce una presión selectiva considerable en favor de visones más resistentes/tolerantes<sup>6</sup> y, probablemente, en contra de cepas víricas de alta virulencia. Esta selección hacia un equilibrio entre el virus y su hospedador se realiza en condiciones de granja mediante la eliminación de animales con bajo rendimiento reproductivo (Farid, 2010) o mediante test serológicos capaces de detectar las alteraciones de las proteínas séricas como el IAT (Henson *et al.*, 1962), ELISA (Andersson, 2017) o MALDI-TOFF (Cepica, 2016). Es posible que las variantes más virulentas tiendan a ser eliminadas de las granjas mediante despoblación y desinfección (*stamping-out*); alternativamente, la selección de animales resistentes/tolerantes en condiciones de infección endémica favorecería simultáneamente las variantes de menos virulencia, hasta el punto de que sustituyan completamente a la cepa original. En su ciclo silvestre parece improbable que las cepas de alta virulencia consigan prosperar, ya sea debido a la muerte temprana de los animales infectados como al fracaso reproductivo. No obstante, se necesitan aún nuevos estudios capaces de explicar a nivel biológico y molecular cuales son las características que confieren a una cepa la alta infecciosidad y/o virulencia que caracteriza a los brotes epizooticos de la enfermedad en algunas granjas y cuáles son las vías predominantes de contagio en estos casos.

#### 1.4.3.3. Otros factores epidemiológicos

##### 1.4.3.3.1. El papel de la forma no-progresiva en la epidemiología

Los animales con la forma no-progresiva de la enfermedad son capaces de transmitir el virus de forma vertical y horizontal tanto por contacto directo como indirecto, pero en todos los casos en menor medida que los que presentan la forma progresiva (An y Ingram, 1978). El trabajo de Hadlow *et al.* (1985) muestra que, aunque la viremia está presente en el visón que padece AD, ésta no existe en el visón infectado subclínicamente (forma no progresiva), en el que está ausente o presente en títulos bajos y de manera transitoria. En este mismo trabajo, realizado sobre visón Pastel infectado con la cepa Pullman (baja virulencia), la ausencia de virus en el riñón, el hígado y el intestino en varios visones después del día 28 pi sugiere que algunos animales infectados subclínicamente no eliminan el virus en la orina o las heces y, por lo tanto, no serían fuentes probables de virus para la transmisión horizontal. Además, la ausencia de viremia en el visón infectado subclínicamente reduciría las posibilidades de contaminar los guantes con sangre cuando se manipulan los animales. También, según estos autores, la viremia tiene otra implicación epidemiológica aún más importante: como regla general, se considera necesaria una gran cantidad de virus circulando en la sangre de la madre durante un período prolongado para que la mayoría de las infecciones virales se transmitan al feto.

---

<sup>6</sup> **Resistencia** se define como la capacidad para limitar la carga del patógeno; en contraposición, **tolerancia** es la capacidad para limitar los daños originados por dicha carga. Ambos conceptos se desarrollan en la sección dedicada al control de la enfermedad (Råberg *et al.*, 2007).

#### 1.4.3.3.2. Factores de riesgo en la infección de granjas libres de la enfermedad

Estudios epidemiológicos realizados en Dinamarca establecieron que las granjas a menos de 1 km de una granja infectada presentan un riesgo significativamente mayor de verse infectadas, lo que los autores atribuyen a la transmisión horizontal a través de herramientas intercambiadas o a través de fauna silvestre común en áreas agrícolas; además, establecieron también como riesgo significativo el que una granja haya presentado uno o más animales positivos en la temporada anterior (Chriél, 2000a). Otros factores de riesgo están asociados al tamaño de la granja y el porcentaje de granjas vecinas infectadas, aumentando la probabilidad de infección a medida que aumentan esos dos factores (Espregueira Themudo *et al.*, 2011, 2012). La transmisión entre granjas es posible a través de equipos compartidos o la compra de equipos usados procedentes de granjas infectadas, vehículos de transporte o de alimentación contaminados, y posiblemente también a través de corrientes de agua contaminadas o incluso por el aire (Chriél, 2000a; Espregueira Themudo *et al.*, 2012). El papel de los visitantes de granjas (otros granjeros, trabajadores compartidos, personal técnico diverso, inspectores oficiales) implica también sin duda un riesgo que no ha sido suficientemente evaluado (Knuuttila, 2015).

#### 1.4.3.3.3. La fauna silvestre

En su medio natural, dado el estilo de vida solitario y territorial del visón, la transmisión horizontal (directa o indirecta) no es fácil en condiciones de vida silvestre; sin embargo, la transmisión vertical asegura el mantenimiento del virus entre una generación y la siguiente (Gorham *et al.*, 1976). Se ha sugerido que el visón de granja puede infectarse del visón silvestre o viceversa; así, por ejemplo, se ha detectado ADN vírico en el 57,6% (n=139) del visón silvestre en Suecia, aumentando la probabilidad de estar infectado con la edad del animal (Persson *et al.*, 2015). Se han detectado también anticuerpos anti AMDV en el visón europeo y otros pequeños carnívoros en el suroeste de Francia (Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004), mientras que otros autores obtuvieron resultados similares en el visón americano silvestre en Canadá (Farid *et al.*, 2010; Nituch *et al.*, 2011). En Estados Unidos se asoció un brote en visón con mapaches infectados por la misma cepa de virus (Oie *et al.*, 1996). Estudios daneses realizados durante el periodo 1998-2001 mostraron que el 11% de visones silvestres eran positivos en la región de Vendsyssel en el norte de Dinamarca, donde la infección por AMDV en visón de granja es endémica (Willadsen y Dietz, 2009, citados por Espregueira Themudo *et al.*, 2012). El visón silvestre se asoció también a la reintroducción del AMDV en una granja en Islandia en 1996, tras la erradicación de la enfermedad en 1984 (Gunnarsson, 2001). En España, se ha demostrado una prevalencia de anticuerpos similar en visón americano silvestre y en visón europeo, alrededor del 32%, con diferencias acusadas en el visón americano silvestre entre diferentes áreas geográficas: desde el 5,6% en Cataluña al 47% en Galicia (Mañas *et al.*, 2016). Sin embargo, en un estudio sobre la población de visón europeo en Navarra no se encontró ningún animal con serología positiva sobre un total de 84 visones examinados (Sánchez-Migallón Guzmán *et al.*, 2008).



#### 1.4.4. Epidemiología molecular del AMDV

En lo que respecta al AMDV, los estudios filogenéticos realizados mediante técnicas de biología molecular han sido utilizados con diferentes objetivos:

- Evaluar posibles entradas de diferentes cepas en el tiempo en un territorio (Knuuttila *et al.*, 2009; Virtanen *et al.*, 2019).
- Estudiar el posible origen de las cepas encontradas en una zona al compararlas con las de otras regiones (Li *et al.*, 2012; Sang *et al.*, 2012; Xi *et al.*, 2016).
- Comparar las cepas detectadas en animales de granja y silvestres para estudiar la posible transmisión de virus entre ambas poblaciones (Mañas *et al.*, 2001; Nituch *et al.*, 2011, 2012; Jakubczak *et al.*, 2017; Virtanen *et al.*, 2019).
- Contribuir al éxito de la erradicación al permitir rastrear las rutas de propagación del virus e identificar los medios de introducción del virus en poblaciones susceptibles (Olofsson *et al.*, 1999; Christensen *et al.*, 2011; Hagberg *et al.*, 2017; Ryt-Hansen *et al.*, 2017; Virtanen *et al.*, 2019).

La mayoría de los trabajos sobre homología entre secuencias y filogenia se basan en la comparación de determinados fragmentos de los genes NS1, VP2 o una combinación de ambos (Gottschalck *et al.*, 1991, 1994; Oie *et al.*, 1996; Schuierer *et al.*, 1997; Olofsson *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2001; Knuuttila *et al.*, 2009b; Jahns *et al.*, 2010; Christensen *et al.*, 2011; Sang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Canuti *et al.*, 2015, 2016; Leimann *et al.*, 2015; Xi *et al.*, 2016; Ryt-Hansen *et al.*, 2017b; Jakubczak *et al.*, 2017). La secuencia genética de referencia en estos estudios es la del AMDV-G, la principal cepa adaptada a cultivo celular y la primera en ser secuenciada (Bloom *et al.*, 1988). Los fragmentos estudiados varían de unos autores a otros y los árboles filogenéticos resultantes difieren según el fragmento y el gen estudiado (Canuti *et al.*, 2015, 2016; Xi *et al.*, 2016; Virtanen *et al.*, 2019). El gen NS1 en su conjunto presenta un porcentaje de variación mayor que el VP2 (Canuti *et al.*, 2016; Hagberg *et al.*, 2016a; Virtanen *et al.*, 2019), y determinados fragmentos del mismo o la totalidad del gen han sido utilizados en múltiples estudios filogenéticos (Gottschalck *et al.*, 1994; Schuierer *et al.*, 1997; Olofsson *et al.*, 1999; Knuuttila *et al.*, 2009b; Christensen *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Leimann *et al.*, 2015; Canuti *et al.*, 2016; Xi *et al.*, 2016; Virtanen *et al.*, 2019). También el gen VP2 ha sido utilizado en este tipo de estudios, tanto el gen completo como fragmentos que contienen la región hipervariable, y con especial atención hacia esa región en concreto ya que contiene determinantes del rango de hospedador, patogenia y antigenicidad (Gottschalck *et al.*, 1991; Oie *et al.*, 1996; Schuierer *et al.*, 1997; Bloom *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Canuti *et al.*, 2016; Jakubczak *et al.*, 2017; Virtanen *et al.*, 2019). La filogenia con fragmentos concatenados de los genes NS1 y VP2 ha sido realizado por algunos autores, encontrando una mayor resolución en los árboles contruidos de este modo que los contruidos con un fragmento de uno solo de los genes (Leimann *et al.*, 2015; Xi *et al.*, 2016).

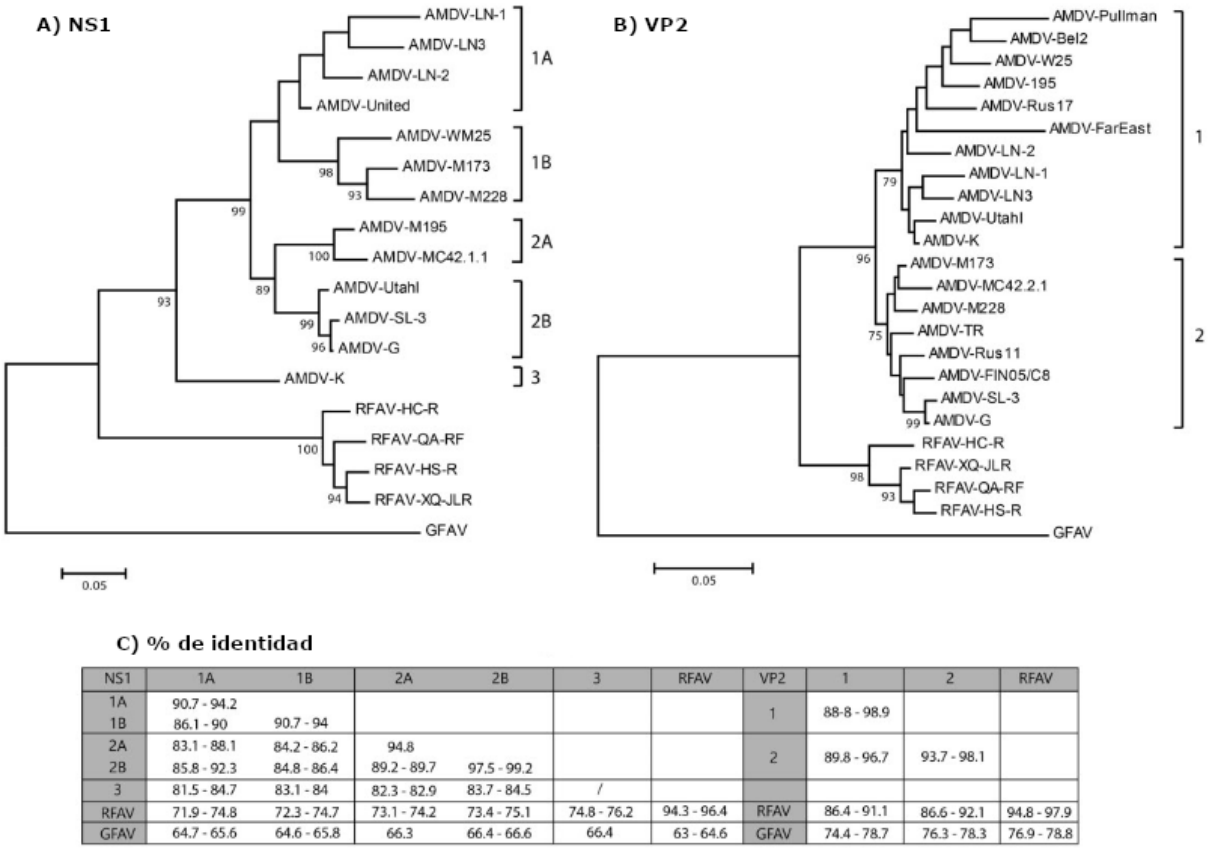
En general, estos trabajos muestran que las cepas de AMDV descritas a nivel global pueden agruparse en 3-8 grupos diferentes (Knuuttila *et al.*, 2009b; Wang *et al.*, 2014; Canuti



*et al.*, 2015, 2016; Leimann *et al.*, 2015; Virtanen *et al.*, 2019). Las mejores resoluciones en cuanto a las relaciones filogenéticas se obtienen comparando la secuencia de aminoácidos completa de las proteínas NS1 y VP2 (figura 12) (Canuti *et al.*, 2015, 2016). En base a la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 se reconocen 3 tipos principales de AMDV: I, II y III (Canuti *et al.*, 2015, 2016). Cabe señalar que el tipo III, representado por el AMDV-K, presenta una homología inferior al 85% en la secuencia de aminoácidos de la proteína NS1 con respecto a las otras cepas, por lo que sería encuadrable como una especie diferente según los criterios del ICTV (Cotmore *et al.*, 2014; Canuti *et al.*, 2016). Los análisis basados en las secuencias de las proteínas de la cápside revelan agrupaciones diferentes a las de la proteína NS1, lo que sugiere la existencia de genomas quiméricos generados por recombinación (Canuti *et al.*, 2015, 2016). La comparación de secuencias completas del área codificante del genoma en cepas finlandesas de origen tanto de granja como silvestre indica igualmente frecuentes recombinaciones en diferentes áreas del genoma, lo que da como resultado árboles diferentes según la región estudiada; sin embargo, determinados subclusters tienden a permanecer juntos aunque se agrupen en clados diferentes en cada tipo de árbol, lo que sugiere que estos eventos de recombinación se produjeron mucho tiempo atrás (Virtanen *et al.*, 2019).

Las cepas del AMDV no parecen agruparse en base a su virulencia ni tampoco en base al país de detección (Knuuttila *et al.*, 2009; Nituch *et al.*, 2012; Olofsson *et al.*, 1999; Schuierer *et al.*, 1997); no obstante, sí se han podido establecer relaciones basadas en su origen geográfico en algunos casos (Christensen *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 2012; Nituch *et al.*, 2012; Sang *et al.*, 2012) y también entre reservorios de granja y de vida silvestre (Jensen *et al.*, 2012; Nituch *et al.*, 2012; Virtanen *et al.*, 2019). En Estonia y Polonia, por ejemplo, se encontró que el AMDV obtenido de visón silvestre se agrupaba separado de las cepas de granja (Leimann *et al.*, 2015; Jakubczak *et al.*, 2017). Se ha observado la presencia de varios genotipos sin relación temporal en una misma zona geográfica, lo que sugiere la entrada del virus en dichas zonas en ocasiones diferentes; así, el comercio internacional y local estaría jugando un papel fundamental en esta dispersión y coexistencia geográfica de las diferentes cepas (Knuuttila *et al.*, 2009; Virtanen *et al.*, 2019). También se ha detectado la coexistencia de diferentes cepas en una misma granja e incluso en un mismo individuo (Olofsson *et al.*, 1999; Jahns *et al.*, 2010; Canuti *et al.*, 2016; Virtanen *et al.*, 2019). Sin embargo, aún es difícil establecer conclusiones sobre los resultados obtenidos por este tipo de trabajos dado que los estudios son todavía escasos, incluyen un número limitado de cepas y en su mayoría solamente un fragmento de uno de los genes (Knuuttila, 2015; Canuti *et al.*, 2016; Virtanen *et al.*, 2019). En un amplio estudio realizado sobre la diversidad genética del AMDV en Dinamarca se ha encontrado que los “cuellos de botella” impuestos por las campañas de erradicación han derivado en una purificación selectiva que excede la generación de diversidad creada por mutación, dando como resultado la agrupación de las cepas danesas en un cluster muy homogéneo en comparación con las de otros países como Holanda, Suecia y Finlandia, incluidos en dicho estudio. Así, la alta diversidad genética y presencia de coinfecciones en una misma granja o individuo reportados por otros autores en diversos países parece ser en cierta medida el reflejo de una extrema diversidad genética del virus en los

visones originalmente importados, así como también de los patrones comerciales dentro y entre los diferentes países (Christensen *et al.*, 2011).



**Figura 12.** Análisis de las regiones completas de codificación del AMDV. (A) Árbol filogenético construido con la secuencia completa de la proteína NS1. El resultado del análisis bootstrap se muestra al lado de los nodos y las longitudes de las ramas son proporcionales a las distancias genéticas como lo indica la barra de escala. (B) Idem al anterior pero basado en la secuencia completa de la proteína VP2. (C) Tabla de identidades calculadas dentro y entre los grupos considerando las secuencias de proteínas NS1 y VP2. Los valores indican el rango de identidad entre pares de secuencias y se expresan como porcentajes. Los clados corresponden a los indicados en los árboles mostrados en los paneles A y B. AMDV-: diferentes cepas del *Carnivore amdoparvovirus 1*; RFAV-: *Carnivore amdoparvovirus 3*; GFAV: *Carnivore amdoparvovirus 2* (adaptado de Canuti *et al.*, 2016, con permiso de Oxford University Press).

En cuanto a las nuevas herramientas de biología molecular, recientemente se han realizado los primeros estudios filogenéticos de cepas de campo basados en el genoma completo obtenido mediante “secuenciación de próxima generación” (NGS: next generation sequencing). La resolución obtenida de este modo es muy superior a la que se consigue comparando fragmentos del gen NS1 o VP2, independientemente del fragmento elegido; así, mediante el empleo este método se consigue realizar estudios epidemiológicos mucho más precisos y una mejor reconstrucción de las rutas de propagación (Hagberg *et al.*, 2017; Virtanen *et al.*, 2019).

### 1.5. PATOGENIA, CUADRO CLÍNICO Y LESIONES

Aunque no es nuevo que un parvovirus cause distintos síndromes dependiendo de la edad del hospedador y el momento de la infección, el AMDV se caracteriza por ser capaz de causar tanto enfermedad aguda como crónica en el mismo hospedador (revisado por Alexandersen, 1990). Así, los diferentes síndromes causados por el AMDV van desde:

- I. Neumonía intersticial en crías recién nacidas (Larsen *et al.*, 1984; Alexandersen, 1986).
- II. Infección persistente, glomerulonefritis y arteritis crónicas mediadas por inmunocomplejos (Porter y Larsen, 1967; Porter *et al.*, 1973; Hadlow *et al.*, 1983).
- III. Descenso de fertilidad y abortos (Padgett *et al.*, 1967; Gorham *et al.*, 1976; Alexandersen, 1986).

#### 1.5.1. La enfermedad en crías recién nacidas

En crías nacidas de madres negativas —carentes de anticuerpos frente al virus—, la infección por AMDV produce una neumonía intersticial aguda alrededor de los 12 dpi (revisado por Best y Bloom, 2006). La infección experimental de las crías al nacimiento, tanto por vía intraperitoneal como aerógena, conduce al desarrollo de esta forma de la enfermedad, mientras que las crías inoculadas a las 3 y 8 semanas de vida no desarrollan la neumonía; la enfermedad tampoco se produce en crías nacidas de madres con serología positiva al AMDV (Alexandersen, 1986). Además, la administración en el momento de la infección de gammaglobulinas anti-AMDV de visón o de anticuerpos monoclonales de ratón frente a las proteínas capsulares del AMDV reducen la gravedad de los signos clínicos y la mortalidad en un 50-70% (Alexandersen *et al.*, 1989). Los síntomas se caracterizan por la aparición repentina de una seria disnea de desenlace generalmente fulminante y fatal. Las lesiones macroscópicas se limitan al parénquima pulmonar, que no colapsa, está enrojecido y presenta cierto grado de consolidación. Histológicamente el pulmón presenta una extensa atelectasia, formación de membranas hialinas, hiperplasia e hipertrofia de los neumocitos tipo II, cuerpos de inclusión intranucleares y edema intersticial. Estos cuerpos de inclusión se observan también, pero en mucha menor medida, en algunos hepatocitos y células de los túbulos renales (Alexandersen y Bloom, 1987). Es de resaltar que no se observan lesiones en el epitelio bronquial ni acúmulos de células mononucleares en el pulmón (Alexandersen, 1986). Experimentalmente, todas las cepas ensayadas excepto la AMDV-G son capaces de producir esta forma de la enfermedad. Sin embargo, la morbilidad y mortalidad varían según las diferentes cepas; así, las más virulentas, como la Utah-1 o la DK, producen una morbilidad y mortalidad mayor del 90% mientras que las de baja virulencia (Pullman, GL) producen una morbilidad del 50-70% y una mortalidad del 30-50%. Las crías que sobreviven a la infección desarrollan más tarde la forma clásica de la AD en animales adultos (Larsen *et al.*, 1984; Alexandersen, 1986; Alexandersen *et al.*, 1994a). El virus se multiplica de forma permisiva en los neumocitos tipo II, responsables de la producción de surfactante alveolar; se supone que la alteración de la producción de este producto, vital para facilitar el intercambio gaseoso en los alveolos, es la causa de la insuficiencia respiratoria. Los niveles de formas replicativas del ADN viral en los neumocitos tipo II infectados son muy elevados ( $\sim 10^5$ ), similares a los que

se alcanzan en cultivo celular, y se ha estimado que aproximadamente el 10% de estas células están infectadas (Bloom *et al.*, 1994). Se produce también una intensa viremia, de hasta  $5 \times 10^8$  genomas/ml de suero. El virus puede encontrarse además en otros tejidos, si bien en la mayoría de los casos se trata de viriones secuestrados o con niveles de replicación muy inferiores a los que se producen en el pulmón, en un patrón restrictivo más semejante al que se observa en visón adulto (Alexandersen *et al.*, 1987, 1989; Alexandersen y Bloom, 1987). Por lo tanto, la enfermedad es el resultado de una infección aguda, permisiva y citopática similar a la observada *in vitro* con AMDV-G o *in vivo* con otros parvovirus (revisado por Best y Bloom, 2006).

El mecanismo específico por el cual los anticuerpos protegen a las crías recién nacidas no está claro, ya que el número absoluto de neumocitos tipo II infectados no difiere entre las crías tratadas y no tratadas con anticuerpos anti-AMDV. Sin embargo, los niveles intracelulares de formas replicativas del ADN así como de ARNm se redujeron en al menos 100-1.000 veces en comparación con los observados en el visón no tratado o en la infección permisiva en células CRFK (Alexandersen *et al.*, 1987, 1989; Bloom *et al.*, 1994). La modulación de la infección por AMDV en crías mediada por los anticuerpos es sólo un ejemplo del papel importante y complejo que éstos juegan en la AD (revisado por Best y Bloom, 2006).

### 1.5.2. La infección en visones adultos

El resultado de la infección por AMDV en el visón adulto depende del genotipo del visón, de la cepa del virus, así como del momento, la dosis y la vía de infección (Porter *et al.*, 1980; Hadlow *et al.*, 1983; Aasted y Hauch, 1988; Jensen *et al.*, 2014; Farid y Hussain, 2019, 2020). El visón genotipo aleutiano (aa) es susceptible a la infección con casi todas las cepas de AMDV (excepto la AMDV-G), desarrollando casi invariablemente la forma progresiva de la enfermedad (Porter *et al.*, 1980; Hadlow *et al.*, 1983). La susceptibilidad del visón no aleutiano es más variable, lo que resulta en tres cursos posibles tras la infección:

- a) Una enfermedad progresiva típica o forma clásica.
- b) Una infección persistente no-progresiva.
- c) Una infección no-progresiva/no-persistente.

Cabe señalar que todos los visones infectados desarrollan títulos robustos de anticuerpos anti-AMDV, independientemente de si se produce o no la forma progresiva de la enfermedad (Bloom *et al.*, 1994; Best y Bloom, 2006).

#### 1.5.2.1. Las formas de la enfermedad en visones adultos

##### 1.5.2.1.1. La forma progresiva de la enfermedad (forma clásica)

En la forma clásica de la AD la replicación vírica se produce en compartimentos del sistema inmune asociados a la proliferación celular, como la médula ósea y los centros germinales estimulados de los linfonodos (Oleksiewicz y Alexandersen, 1997). Tras la infección primaria, vía oral o respiratoria, el virus es diseminado por los macrófagos al hígado, bazo, médula ósea y otros órganos linfoides. Se produce entonces un segundo ciclo de replicación en los linfocitos B o pre-B (revisado por Patel *et al.*, 2012). Los macrófagos

juegan un papel central en la replicación y patogenia de la AD, ya que además de ser el lugar de replicación primaria son también el lugar donde se produce el secuestro del virus; entre un 20-30% de los macrófagos aislados de visones infectados contenían ADN vírico mientras que sólo el 1-2% presentaba ARNm vírico, lo que sugiere por lo tanto que sólo estos últimos soportaban la replicación (Kanno *et al.*, 1992; revisado por Best y Bloom, 2006). Las células dendríticas foliculares podrían ser también lugares de secuestro y replicación viral y estar involucradas en la desregulación de la respuesta inmunitaria que conduce a la HGG (Mori *et al.*, 1991). Pese al carácter crónico y progresivo, el virus se replica con rapidez una vez producida la infección. En la infección experimental, el pico de replicación vírica se produce a los 10 dpi, alcanzando títulos de  $10^9$  DI<sub>50</sub> por gramo de homogeneizado de bazo y títulos similares a partir de hígado y linfonodo mesentérico, mientras que hacia los 2 mpi los títulos del bazo decaen hasta  $10^5$  DI<sub>50</sub> y los del suero a  $10^4$  DI<sub>50</sub> (Porter *et al.*, 1980) (una DI<sub>50</sub> equivale a unos 100 genomas; Bloom *et al.*, 1987). De manera similar, mediante pruebas de hibridación se han detectado  $4 \times 10^8$  y  $4 \times 10^9$  genomas por ml de suero a los 5 y 10 dpi respectivamente, decayendo dichas cargas hasta  $4 \times 10^7$  y  $4 \times 10^6$  genomas por ml de suero a los 20 y 60 dpi respectivamente (Alexandersen *et al.*, 1988). La evolución de la infección experimental con la cepa danesa Saeby/DEN/799.1/05 (prevalente en las granjas danesas), por vía IP y en dosis calculadas para el establecimiento de infecciones crónicas fue monitorizada por Jensen *et al.* (2014) durante un periodo de 8-16-24 semanas, utilizando PCR para la detección del ADN vírico y CIEP para la detección de anticuerpos; bajo dichas condiciones se observó en todos los animales una viremia transitoria entre la 1ª y 3ª spi que persistió durante las 24 semanas que duró la prueba en 2 de los 10 visones salvaje de ese grupo y una seroconversión al test CIEP a las 2-3 spi, generalmente en coincidencia con la viremia, que persistió durante todo el periodo de prueba (Figura 13). La replicación del virus *in vivo* no está asociada a lesiones *per se*, pero induce una respuesta inmunológica extrema frente a los antígenos víricos (Porter y Cho, 1980); esto es el resultado de una proliferación incontrolada y policlonal de linfocitos B y células plasmáticas en tejidos linfoides y no linfoides, que conduce a hipergammaglobulinemia (HGG) y enfermedad mediada por IC caracterizada por glomerulonefritis, nefritis intersticial y arteritis (Henson *et al.*, 1976; Patel *et al.*, 2012).

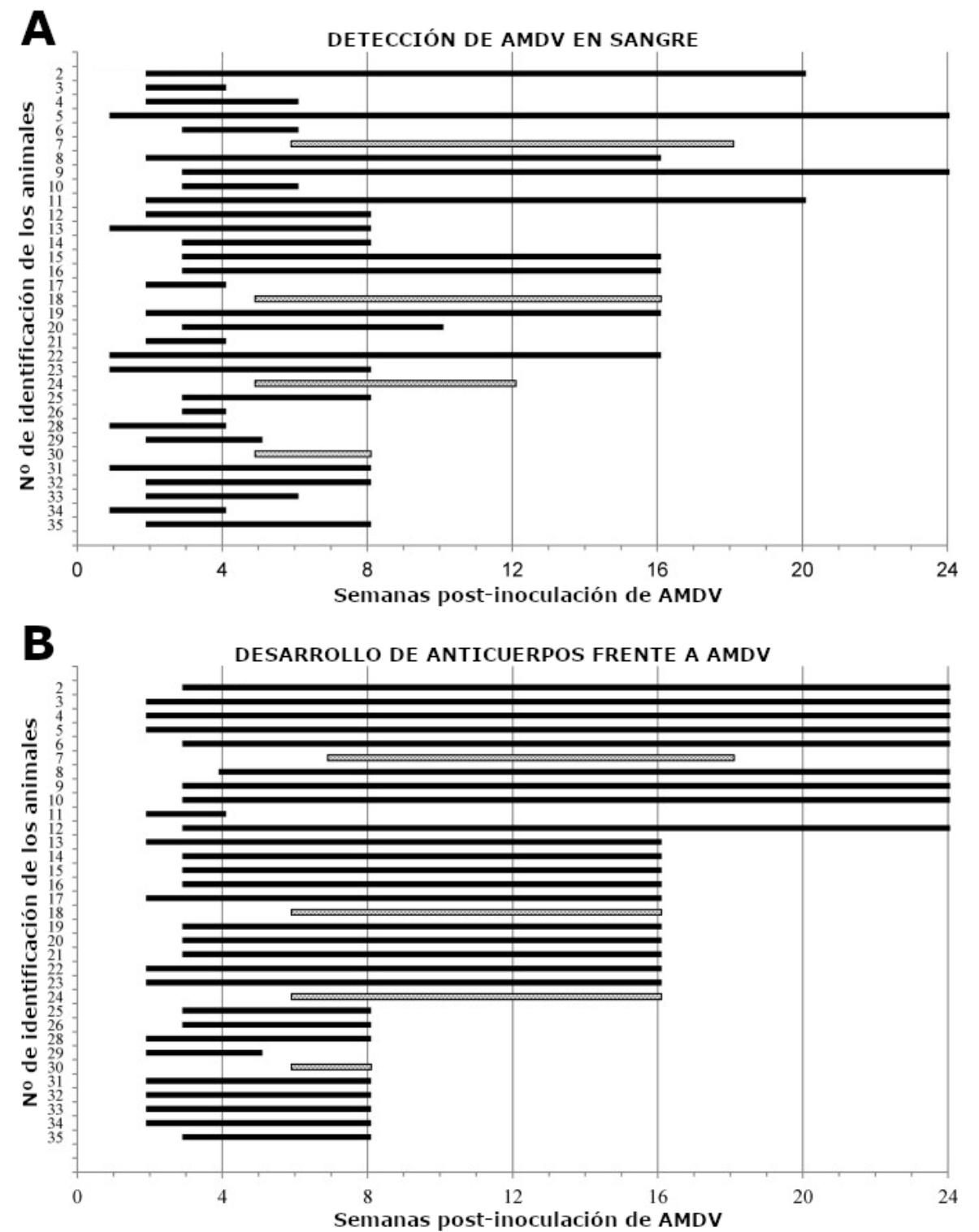


Figura 13. Detección de AMDV en sangre (A) y desarrollo de anticuerpos frente al AMDV (B) tras la infección experimental. Barras negras: visión wild, infección experimental. Barras grises: visión zafiro (aa), animales centinela (adaptado de Jensen *et al.*, 2014, con permiso de Elsevier).



#### 1.5.2.1.2. *La forma persistente no-progresiva*

La forma persistente no-progresiva de la AD cursa con ligera o nula elevación de las gammaglobulinas, persistencia del virus en diversos órganos, bajos pero persistentes títulos de anticuerpos específicos y ausencia de lesiones (Bloom *et al.*, 1975; Hadlow *et al.*, 1985). Ha sido denominada también como forma inaparente de la enfermedad aleutiana, y definida como la que presentan aquellos animales que dos meses después de ser positivos al test CIEP presentan niveles de gammaglobulinas inferiores al 21% de la proteína sérica total, títulos de anticuerpos inferiores a 256 y ausencia de lesiones. El curso de la infección no varía cuando estos animales son sometidos a estrés, pero al ser expuestos a una alta dosis de virus desarrollan la forma progresiva de la enfermedad, indicando que no son altamente resistentes a la AD (An y Ingram, 1977; An *et al.*, 1978). Recientes trabajos usando inoculación intranasal y dosis decrecientes de inóculo de una cepa de campo de mediana virulencia sugieren que, además de factores genéticos del hospedador, la dosis infectante puede condicionar el curso de la enfermedad (Farid y Hussain, 2020). En su revisión de la enfermedad, Porter y Cho (1980) describieron infección asintomática por AMDV en el 39% de los visones pastel de granja (genotipo no aleutiano) infectados de forma natural, mientras que el porcentaje ascendía hasta el 80% en visones silvestres seropositivos.

#### 1.5.2.1.3. *La infección no-progresiva/no-persistente*

Este curso de la enfermedad se caracteriza por presentar alteración inmunológica atenuada y reversible, pronunciado descenso del título de anticuerpos y eliminación del virus del organismo, o al menos su confinamiento a niveles no detectables; habiéndose encontrado que estos animales no transmitían la enfermedad por vía trasplacentaria (Larsen y Porter, 1975; Hadlow *et al.*, 1984). Esta forma no-progresiva/no-persistente fue detectada en alrededor del 25% del visón pastel infectado experimentalmente con cepas de baja patogenicidad, observándose no obstante que dicha resistencia no era genéticamente transmisible a la descendencia (Larsen y Porter, 1975) ni confería protección frente a cepas de alta virulencia como la Utah-1 (Hadlow *et al.*, 1984).

### 1.5.2.2. Factores implicados en la patogenia de la enfermedad

#### 1.5.2.2.1. *El síndrome de Chediak-Higashi*

Las mutaciones azules (aa) tales como el visón aleutiano, zafiro y violeta, son más susceptibles a la AD, así como son más propensas a presentar abscesos y a padecer infecciones (Padgett *et al.*, 1964, 1969; Bloom *et al.*, 1975; Hadlow *et al.*, 1983; Anistoroei *et al.*, 2013). La dilución de la pigmentación y susceptibilidad a las infecciones que caracteriza a estas variedades es el resultado de un desorden lisosomal denominado síndrome de Chediak-Higashi, que está originado por la mutación del gen regulador del tráfico lisosomal (LYST: lysosomal trafficking regulator) y que ha sido descrito también en seres humanos y otras especies (Anistoroei *et al.*, 2013). Debido a este desorden, los visones afectados por este síndrome tienen disminuida su capacidad para destruir los IC internalizados por las células fagocíticas (Alexandersen, 1990; Parrish, 2016).

#### 1.5.2.2.2. La hipergammaglobulinemia y la respuesta inmunitaria humoral

La hipergammaglobulinemia es el signo distintivo de la enfermedad y se instaura ya a partir de las 4 semanas postinfección (Haagsma, 1969); es progresiva y policlonal, con niveles de gammaglobulinas superiores a 30 mg/ml en algunos casos, llegando a superar el 50% de las proteínas séricas totales. Se caracteriza por los altos niveles de anticuerpos de alta afinidad, tanto frente las proteínas capsulares como las no estructurales. Hacia el día 40 pi se ha observado cierto nivel de descenso en la heterogeneidad de la HGG, y hasta un 10% de los visones que sobreviven más de un año a la infección desarrollan una HGG monoclonal (revisado por Porter y Cho, 1980; revisado por Bloom *et al.*, 1994).

Los anticuerpos anti-AMDV pueden detectarse ya al 5° dpi, indicando una rápida respuesta inmune frente al virus (Bloom *et al.*, 1994, Porter y Cho, 1980). La primera respuesta humoral demostrable tras la infección es una elevación transitoria de las IgM; además, pueden demostrarse también niveles bajos de IgA específicas frente AMDV durante el curso de la infección (Porter *et al.*, 1984). Una parte de los anticuerpos producidos van dirigidos contra péptidos producto de la degradación proteolítica de las proteínas capsulares *in vivo*, y se producen también anticuerpos frente a las proteínas no estructurales. Sin embargo, estos anticuerpos no son neutralizantes ni cuando se produce la enfermedad clílica ni tampoco en las infecciones inaparentes (An *et al.*, 1978), aunque sí neutralizan la infectividad *in vitro* (Bloom *et al.*, 2001); en relación con esto, se ha postulado que la ausencia de esta capacidad neutralizante puede deberse al enmascaramiento por fosfolípidos de determinadas zonas antigénicas del virión (Stolze y Kaaden, 1987; Alexandersen, 1990; Parrish, 2016). El título de anticuerpos alcanza valores de 5.000-80.000 en visones con HGG (Cho y Ingram, 1973); una vez el título de anticuerpos anti-AMDV alcanza estos títulos, generalmente se estabilizan (Porter y Cho, 1980). Además de anticuerpos anti-AMDV, también se forman autoanticuerpos anti-ADN (Aasted, 1980; Hahn y Hahn, 1983; Mouritsen *et al.*, 1989). Bloom *et al.* (1975) estudiaron la respuesta del visón zafiro y pastel a la infección experimental con la cepa Pullman con dosis decrecientes de inóculo, encontrando que los títulos máximos de anticuerpos anti-AMDV en el visón zafiro se alcanzan cuando los niveles de gammaglobulinas no han superado aún el 20%, y permanecen relativamente constantes a pesar de que las gammaglobulinas suben progresivamente hasta alcanzar valores del 40-50% de las proteínas séricas; todo esto sugiere que existen otros componentes de la fracción de las gammaglobulinas que intervienen en esta alteración. El empleo de la técnica MALDI-TOF para diagnosticar la susceptibilidad a la AD determinando las alteraciones de las proteínas séricas mediante el cociente albumina/globulina se ha justificado precisamente por esta falta de correlación entre el nivel de anticuerpos específicos y la HGG (Cepica *et al.*, 2012; Cepica, 2016).

#### 1.5.2.2.3. El papel de los inmunocomplejos

La unión de los anticuerpos a los antígenos virales junto con la incorporación de la fracción C3 del complemento da lugar a la formación de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo (Porter y Larsen, 1967; Porter *et al.*, 1973; Hahn, 1984). Parte del antígeno de los IC son subproductos de la degradación *in vivo* de las proteínas víricas (Aasted *et al.*, 1984b),

mientras otra parte son partículas víricas que conservan su capacidad infectiva (revisado por Porter *et al.*, 1980). Los IC se depositan en el glomérulo renal y otros tejidos, iniciando una reacción de hipersensibilidad tipo III (Parrish, 2016) que conduce al desarrollo de una enfermedad renal progresiva caracterizada por glomerulonefritis mesangial proliferativa y nefritis intersticial grave; además, se produce también una arteritis necrotizante en las pequeñas arterias musculares de diversos órganos, como corazón, hígado, estómago, intestino, cerebro y riñón (Porter *et al.*, 1980).

#### 1.5.2.2.4. Intensificación de la infección dependiente de anticuerpos

Otra dimensión del papel del anticuerpo unido al virus es que puede facilitar la entrada de AMDV en los macrófagos a través de la unión de la porción Fc del anticuerpo a los receptores Fc o del complemento de determinadas poblaciones celulares como los macrófagos (Kanno *et al.*, 1993a; Best y Bloom, 2006; Mora y Rosales, 2009). Este aumento de la infectividad del virus mediada por anticuerpos se denomina “intensificación de la infección dependiente de anticuerpos” o ADE (Antibody Dependent Enhancement of infection) (Porterfield, 1986), y se ha descrito también en otras infecciones víricas como la producida por el virus Dengue, el virus de la fiebre amarilla, el VIH-1, el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) o el virus de la peritonitis infecciosa felina (revisado por Cancel-Tirado y Yoon, 2003). Una vez dentro de los macrófagos, los anticuerpos pueden influir en la persistencia de la infección al restringir la replicación del virus, de manera similar a lo observado en las crías de visón infectados y tratados con anticuerpos anti-AMDV. Sin embargo, la infección de macrófagos con AMDV puede ocurrir a niveles bajos en ausencia de anticuerpos, y algo similar podría ocurrir en las células del epitelio de los túbulos renales (Bloom *et al.*, 1994). Por lo tanto, es posible una infección temprana de los macrófagos *in vivo*, lo que puede ser un determinante crítico en la replicación temprana del virus, así como en la perturbación de la respuesta inmune (revisado por Best y Bloom, 2006). En la tabla 10 se resume el papel de los anticuerpos en la AD.

**Tabla 10. Resumen de las diferencias entre la replicación del AMDV y el papel de los anticuerpos tras la infección del visón a diferentes edades (adaptado de Best y Bloom, 2006).**

	Momento de la infección		
	Fetal	Crías sin anticuerpos	Adultos
<b>Células diana</b>	Amplio rango de tejidos	Neumocitos tipo II	Macrófagos, linfocitos
<b>Replicación viral</b>	Permisiva	Permisiva, citopática	Restringida, no citopática
<b>Papel de los anticuerpos</b>	Ni protectores ni patogénicos	Atenuantes	Patogénicos: ADE, IC

#### 1.5.2.2.5. Replicación restringida

La replicación del virus en el visón adulto difiere aparentemente de la que se produce en los dos sistemas permisivos que se conocen para este virus (el cultivo en línea celular CRFK y en crías recién nacidas carentes de inmunidad), en el sentido de que en visón adulto las cantidades de los tres tipos de ácidos nucleicos intranucleares (ARNm, formas replicativas del ADN, y el ADNmc del virión) están reducidas por un factor de 10 o más y los ratios relativos

entre estas tres formas de ácidos nucleicos están alteradas (Alexandersen *et al.*, 1988; Kanno *et al.*, 1992).

Bloom *et al.*, (1994) encontraron que, aunque el 20-30% de las células fagocíticas secuestran los IC infectantes, sólo el 1-2% permiten la expresión genética del virus, por lo que concluyen que la restricción a la replicación del ADMV en el visón adulto se produce al menos en dos bloques diferentes. Un primer bloque estaría evidenciado por el limitado número de macrófagos que expresan los productos del virus, lo que podría deberse a que los IC infectantes estarían inertes o bloqueados sobre la superficie celular hasta que se dispare el mecanismo de infección, cuando se iniciaría la infección dependiente de anticuerpos; de hecho, la activación experimental de los macrófagos aumenta la cantidad de células que secuestran el virus. El segundo bloque, evidenciado por las alteraciones observadas en el patrón de transcripción vírica, estaría ligado a factores que controlan la activación y proliferación de los macrófagos. Esta restricción podría estar mediada por la degradación proteolítica de las proteínas estructurales (de hecho, las proteínas víricas en las crías infectadas son degradadas en mucha menor medida que en el visón adulto), o quizás las células diana son semipermisivas al virus *per se*. Finalmente, otro mecanismo de regulación podría estar relacionado con la rápida respuesta humoral del visón adulto en comparación con la que se produce en crías. Se sabe que los anticuerpos anti-AMDV inhiben la producción de ARNm vírico más que la replicación del ADN, lo que restringe la producción de nuevos viriones (revisado por Best y Bloom, 2006). Así, se cree que este hecho es la clave para la evolución hacia la infección persistente que conduce hacia una enfermedad inmunológica (Alexandersen *et al.*, 1994b). La comparación de la replicación en la línea celular CRFK (sistema permisivo) y en la línea de macrófagos humanos K562 (sistema no permisivo) sugiere también que la menor concentración de la proteína no estructural NS2 en el citoplasma de los macrófagos podría prevenir la salida del virión del núcleo de las células infectadas (Kanno *et al.*, 1993a, 1993b; Oleksiewicz *et al.*, 1996, 1998; revisado por Best y Bloom, 2006).

#### 1.5.2.2.6. El papel de las caspasas

Las caspasas son una familia de cisteín-proteasas que tienen un papel crucial en el desmantelamiento gradual de las células apoptóticas (Degterev *et al.*, 2003). La proteína NS1 es en sí misma altamente tóxica para las células, causando apoptosis dependiente de las caspasas después de la transfección en cultivos de células CRFK, y se ha demostrado que parte la proteína NS1 del AMDV es escindida por las caspasas ya en las fases iniciales de la replicación viral (Best *et al.*, 2003); el producto resultante de esta escisión es necesario para la traslocación al núcleo de las moléculas de NS1 no escindidas, donde son imprescindibles para la replicación (revisado por Best y Bloom, 2006). También la expresión de las proteínas de la cápside induce la activación de las caspasas, lo que resulta en la escisión de ambos productos víricos, las proteínas de la cápside y la proteína NS1. Aparentemente, las caspasas activadas por ambos mecanismos están no sólo facilitando la replicación, sino también reduciendo la disponibilidad de proteínas capsulares necesarias para la formación de nuevos viriones, manteniendo de este modo una infección persistente. En conjunto, estos resultados indican

que la actividad de las caspasas desempeña múltiples funciones en la infección por AMDV y que la escisión de las proteínas de la cápside podría tener un papel en la regulación de la infección persistente de AMDV (Cheng *et al.*, 2010).

#### 1.5.2.2.7. El papel de las citoquinas

Diversos estudios han establecido que el visón no produce niveles detectables de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en respuesta a la infección por AMDV (Wiedbrauk *et al.*, 1986b, 1986a; Bloom *et al.*, 1994). Se ha detectado también que la infección con AMDV de cultivos primarios de macrófagos de visón o de la línea de macrófagos humanos K562 induce la producción continuada de IL-6; lo que en el contexto de la estimulación antigénica continuada inducida por la infección persistente podría explicar el desarrollo del desorden inmunitario característico de la AD al orquestar una respuesta inmunitaria tipo Th2 (Bloom *et al.*, 1994). No obstante, estudios más recientes han demostrado un aumento en la producción de citoquinas de ambos tipos de respuesta inmunitaria: Th1 (IFN- $\gamma$ ) y Th2 (IL-4) (Jensen *et al.*, 2003). Los visones adultos que desarrollan la forma no progresiva de la enfermedad podrían ser capaces de montar una respuesta Th1 eficaz o suprimir la generación de la respuesta Th2; así, un predominio de la respuesta Th1 permitiría a los animales controlar el desarrollo del desorden inmunitario (Bloom *et al.*, 1994).

#### 1.5.2.3. Cuadro clínico y lesional

##### 1.5.2.3.1. Cuadro clínico

Durante las primeras fases de replicación del AMDV, cuando los títulos víricos son máximos, no se observan síntomas clínicos ni lesiones (Porter *et al.*, 1969); estas últimas aparecen hacia la 3-4 spi, coincidiendo con el inicio del aumento de los niveles de inmunoglobulinas (Henson *et al.*, 1966a). Tras un periodo de incubación variable, entre 2-18 meses (más corto en los visones de genotipo aleutiano y para cepas de alta patogenicidad), se produce una progresiva pérdida de peso sin descenso apreciable de la ingesta de pienso, así como lasitud y polidipsia. También resulta frecuente ver pienso no digerido en las heces y, a veces, heces negras y alquitranadas (melena). Entre un 10-20% de los animales manifiestamente enfermos presentan úlceras gingivales con tendencia al sangrado (Haagsma, 1969; Porter *et al.*, 1980). A medida que la enfermedad progresa los animales adelgazan (es característico el aspecto afilado de la cabeza) y se instaura una anemia (manifiesta en la palidez de mucosas y almohadillas plantares). La anemia tiene seguramente un origen multifactorial, habiéndose descrito un aumento de las IgG sobre la superficie de los eritrocitos ligado a un descenso de su vida media y una inadecuada o disminuida eritropoyesis (McGuire *et al.*, 1979). No obstante, es de resaltar que el visón con AD progresiva generalmente muestra pocos signos clínicos de enfermedad hasta unos días antes de la muerte. Alrededor del 85% de las muertes se deben a insuficiencia renal, mientras que el resto son causadas o bien por la ruptura de arterias inflamadas o bazos con esplenomegalia, o bien debido a infecciones bacterianas concurrentes (Porter *et al.*, 1980). En ocasiones puede observarse signos neurológicos, tales como comportamiento extraño, ataxia, convulsiones y coma (Gorham *et al.*, 1970a; Dyer *et al.*, 2000). Otros síntomas que pueden estar presentes en algunos animales son el aumento de la cantidad de canas (Farid y Ferns, 2011) y la ceguera



(Gorham *et al.*, 1970a). Cualquier forma de estrés, como el manejo intensivo de los animales, bajadas repentinas de la temperatura o el parto, suele desencadenar una subida brusca de la mortalidad en las granjas afectadas, con picos de mortalidad característicos a finales de abril/principios de mayo entre las hembras reproductoras (partos) y también en otoño, afectando a todas las edades (muda a pelaje de invierno) (Gorham *et al.*, 1965, 1970a; Henson *et al.*, 1966b, 1976; Gorham, 2000). La mortalidad anual en granjas mixtas, con genotipos aleutianos y no aleutianos, es 5-8 veces mayor en los primeros (Gorham *et al.*, 1965). Experimentalmente se ha demostrado una menor capacidad de respuesta inmunitaria humoral y celular frente a diversos antígenos en aquellos visones afectados de AD progresiva (Perryman *et al.*, 1975; Gorham *et al.*, 1976; Porter *et al.*, 1980; An y Wilkie, 1981), lo que podría explicar la mayor susceptibilidad a las infecciones y una inferior respuesta vacunal en las granjas infectadas (Gorham *et al.*, 1976; Porter *et al.*, 1980). Las granjas infectadas experimentan un mayor número de abortos y de hembras vacías, así como mayor mortalidad perinatal (Gorham *et al.*, 1965; Haagsma, 1969; Alexandersen, 1986; Hansen y Lund, 1988). En Dinamarca se ha estimado que las madres positivas presentan una reducción promedio de 0,3-0,5 crías destetadas respecto de las madres no infectadas (Hansen, 1985).

#### 1.5.2.3.2. Lesiones

Macroscópicamente, ya en fases tempranas de la enfermedad, puede observarse linfadenopatía, esplenomegalia (hasta 4-10 veces su tamaño normal), hepatomegalia y petequias en el riñón; en fases más tardías, los riñones se vuelven pálidos, encogidos e irregulares (Henson *et al.*, 1976).

Microscópicamente, la infiltración diseminada de células plasmáticas antecede al resto de las lesiones. Tras la infección experimental, al poco tiempo puede observarse la infiltración de un pequeño número de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas en los espacios porta, pequeñas arterias musculares y en la unión córticomédular del riñón (Henson *et al.*, 1976). Las lesiones hepáticas son las primeras en observarse (Henson *et al.*, 1976; Farid y Hussain, 2019); el aumento de los infiltrados mononucleares en los espacios porta va asociado una proliferación de los conductos biliares, y se observa también una proliferación de los macrófagos en los sinusoides hepáticos. Las lesiones renales dominan el cuadro lesional de la AD: el depósito de IC en el glomérulo produce cambios en la membrana basal y estimulación de las células mesangiales cuya hiperplasia, a la postre, comprime los capilares glomerulares ocasionando el cese de la filtración seguido de uremia y muerte (Henson *et al.*, 1976). Se produce también tubulorrexia y una nefritis intersticial debido a la infiltración de células plasmáticas y linfocitos T (Mori *et al.*, 1992, 1994). En el cerebro se produce meningoencefalitis, caracterizada por infiltrados de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos en meninges, manguitos perivasculares y parénquima cerebral (Jahns *et al.*, 2010; Jensen *et al.*, 2016), así como arteritis necrotizante (Henson *et al.*, 1976; Jahns *et al.*, 2010) y, en ocasiones, infartos hemorrágicos (Henson *et al.*, 1976). La arteritis, una de las lesiones más características de la AD, se observa más frecuentemente en hígado, mucosa gástrica, riñón y vejiga (Henson *et al.*, 1976). En el pulmón se ve básicamente afectado su sistema vascular, sin ninguna otra alteración en el parénquima. En la forma progresiva de la enfermedad

desarrollada por aquellas crías que superan la fase de neumonía intersticial tras la infección experimental al nacimiento se ha descrito una hiperplasia del tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT), así como también una acumulación intraalveolar, de localización subpleural y distribución focal, de grandes células con citoplasma espumoso (neumonía lipídica), si bien esta última lesión se observa también en infecciones naturales de visones adultos (Alexandersen et al., 1994a). La uveítis, principalmente una iridociclitis de gravedad moderada, ha sido descrita como una expresión habitual de la forma progresiva de la enfermedad (Hadlow, 1982).

### 1.5.3. La infección transplacentaria

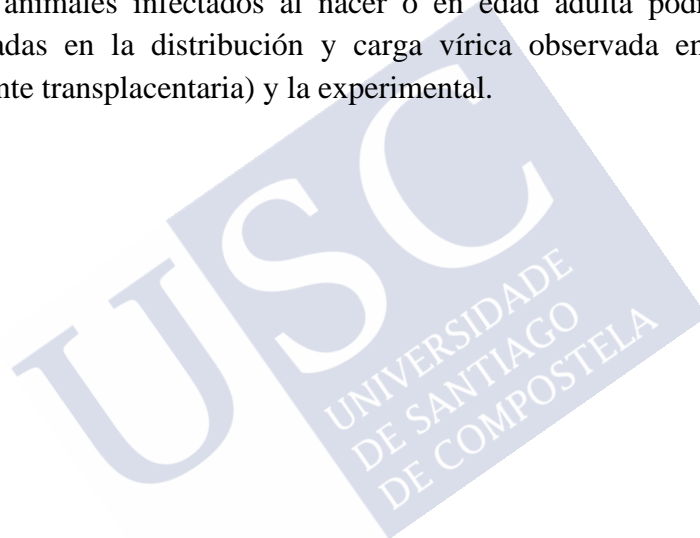
La infección transplacentaria se produce tanto en madres con infección persistente (15 días antes de los apareamientos) como aguda (posterior a la implantación de los embriones). No obstante, Broll y Alexandersen, (1996) observaron que la tasa de muerte y reabsorción fetal es mucho mayor en las hembras con infección persistente. Pese a la presencia de altos títulos de anticuerpos durante la gestación, en las hembras de este grupo se produjo un aumento de las tasas de aborto, absorción fetal y muerte embrionaria. Aunque en el grupo infectado de forma aguda se encontraron títulos víricos mucho más altos en los citotrofoblastos del hematoma placentario, en ambos grupos se detectó virus en una amplia gama de tejidos fetales, incluyendo hígado, bazo, tejido conectivo de la piel, músculo cardíaco, timo, médula ósea, pulmón, y cerebro (Broll y Alexandersen, 1996; Best y Bloom, 2006). Cabe señalar que el número de copias del genoma vírico en el suero materno fue mucho menor que en los fetos; no obstante, tan pronto como las crías obtienen leche de la madre<sup>7</sup>, los anticuerpos maternos se absorben y la concentración de virus en el suero disminuye rápidamente, pero aún así se pueden detectar altas concentraciones víricas y formas replicativas en varios órganos. Las crías infectadas por vía transplacentaria pudieron desarrollarse normalmente hasta al menos seis días después del nacimiento sin que se pudiera detectar en ese periodo ningún tipo de reacción inflamatoria (Broll y Alexandersen, 1996).

La infección transplacentaria puede conducir a una inmunotolerancia parcial a la infección por AMDV. En un estudio experimental (Porter *et al.*, 1977b) describieron una serie de diferencias en el cuadro fisiopatológico y lesional entre crías nacidas de madres infectadas experimentalmente al final del 2º tercio de gestación (infección transplacentaria) y crías infectadas experimentalmente a los 80 días de vida (infección postdestete). La comparación entre ambos grupos a los 83 días de vida o dpi, respectivamente, mostró que en la infección transplacentaria se produce: 1) una reducción marcada de los cambios fisiopatológicos típicos de la forma clásica de la enfermedad, tales como la plasmocitosis, los niveles de GG y los anticuerpos anti-AMDV, 2) mayores cantidades de AMDV infeccioso y número de células que contienen antígeno viral, 3) una reducción de la gravedad de la glomerulonefritis causada por inmunocomplejos y ausencia de arteritis, 4) presencia de antígeno libre en el glomérulo y

<sup>7</sup> La placenta del visón, como la de muchos carnívoros, es de tipo endoteliocorial, por lo que no adquieren anticuerpos maternos a través de la placenta (Broll y Alexandersen, 1996). Las crías nacen sin niveles detectables de inmunoglobulinas, de modo que las adquieren a través del calostro. A los 8 días de edad el nivel de IgG alcanza el mismo nivel que en la madre (Porter *et al.*, 1980).



5) sorprendente acumulación de eosinófilos en los tejidos. No obstante, un segundo grupo de crías infectadas por vía transplacentaria, sacrificado a los 195 días de vida, presentó lesiones, títulos de anticuerpos y cargas víricas similares a los descritos a los 83 dpi en el grupo infectado tras el destete, por lo que más que una verdadera tolerancia a los antígenos víricos lo que se produce es un curso más lento de la enfermedad. Un resultado congruente con el anterior se observó en visones infectados antes del destete, presumiblemente a partir de sus madres, los cuales mostraron un desarrollo de la enfermedad más lento en comparación con los infectados con posterioridad (An y Ingram, 1978). De manera similar, en otro estudio en el que se infectaron experimentalmente crías recién nacidas de madres seronegativas y tratadas con anticuerpos anti-AMDV, una parte de ellas no desarrolló la neumonía clínica típica, sino una forma atenuada de la AD clásica al tiempo que presentaron una mayor carga vírica y una distribución más amplia de los lugares de replicación, tanto en los genotipos (AA) como (aa) (Alexandersen *et al.*, 1989); los autores concluyen que estas diferencias en el curso de la enfermedad entre los animales infectados al nacer o en edad adulta podrían explicar las discrepancias encontradas en la distribución y carga vírica observada entre la infección natural (presumiblemente transplacentaria) y la experimental.



## 1.6. DIAGNÓSTICO

### 1.6.1. Diagnóstico clínico y epidemiológico

La forma clásica de la enfermedad puede ser diagnosticada en base a la sintomatología clínica y/o a factores epidemiológicos (Gorham *et al.*, 1965), así como en base a las lesiones macroscópicas, alteraciones de las proteínas séricas e histopatología (Henson *et al.*, 1963b, 1976; Gorham *et al.*, 1970b; Porter *et al.*, 1980). Sin embargo, esto no permite más que un diagnóstico presuntivo y, lo que es más importante, sólo es posible en fases tardías de la infección, una vez se desarrolla el cuadro lesional y aparecen los primeros animales con sintomatología clínica; para entonces, la enfermedad se habrá extendido ya en la población y se habrá contaminado el ambiente de la granja, en el que el virus es extremadamente persistente (Gorham *et al.*, 1965, 1976; Cho y Ingram, 1974; Cho y Greenfield, 1978). La forma aguda de la enfermedad, la neumonía intersticial en crías recién nacidas, puede también diagnosticarse en base a factores epidemiológicos, sintomatología clínica, cuadro lesional (Alexandersen y Bloom, 1987) e inmunohistoquímica (Hammer *et al.*, 2007).

### 1.6.2. Diagnóstico de laboratorio

#### 1.6.2.1. Técnicas directas

##### 1.6.2.1.1. Aislamiento del virus

En los primeros tiempos de la enfermedad el único modo de demostrar la presencia del virus era la inoculación experimental en visones susceptibles (genotipos aa) y esperar al menos 8 semanas hasta que se desarrolla la enfermedad y el cuadro lesional (Gorham *et al.*, 1965). El virus se logró cultivar por primera vez en cultivo de células CRFK a 31,8°C a partir de la cepa de alta virulencia UTAH-1 (Porter *et al.*, 1977; revisado por Gorham y Shen, 1981). La cepa SL3, aislada de bazo y linfocitos circulantes de visones infectados por AMDV, se replica de forma eficiente en el clon 81 CCC de células de riñón de gato a 31,8°C sin perder su capacidad infectiva para visón (van Dawen *et al.*, 1983; Haas *et al.*, 1990). Algunas cepas, como la AMDV-HLJ son capaces de propagarse en cultivo en la línea celular CRFK durante las tres primeras generaciones (Lu *et al.*, 2018). Pero en general, el aislamiento en cultivo celular no es una opción diagnóstica ya que las cepas de campo del AMDV son, en la mayoría de los casos, difíciles de cultivar (Bloom *et al.*, 1980).

##### 1.6.2.1.2. Técnicas de detección de ácidos nucleicos

**Hibridación *in situ*.** Una de las primeras pruebas diagnósticas basadas en esta tecnología fue la hibridación directa, basada en sondas de oligonucleótidos (25-50 nt) frente a secuencias específicas de ácidos nucleicos virales presentes en muestras clínicas (Bloom *et al.*, 1987; Storch y Wang, 2013). Su utilidad diagnóstica está ligada a la investigación de la asociación entre el virus y las lesiones producidas por éste en los tejidos infectados (Lennette, 2017), pero se ve limitada por el hecho de necesitar concentraciones relativamente elevadas del ácido nucleico diana ( $> 10^4$ - $10^5$  copias del ADN/ARN) (Storch y Wang, 2013); de hecho, se ha estimado que esta técnica es 100 veces menos sensible en la detección del ADN del AMDV que otras técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Alexandersen *et al.*, 1988; revisado por Oie *et al.*, 1996).

**PCR.** Esta técnica molecular emplea pares de cebadores o primers, formados por oligonucleótidos complementarios a una región conocida del ácido nucleico que se desea detectar, y una ADN polimerasa termoestable, como la polimerasa Taq, para lograr amplificar un segmento de ADN diana que normalmente tiene una longitud de 100 a 1.000 bp; la extensión del fragmento amplificado (amplicón) viene determinada por el extremo 5' de cada uno de los cebadores utilizados. La PCR clásica se realiza mediante ciclos repetitivos, cada uno de los cuales consiste en tres pasos que tienen lugar a diferentes temperaturas: desnaturalización (~95°C), alineamiento o unión de los cebadores (~50-55°C) y extensión (~72°C). El proceso se realiza en un aparato denominado termociclador, que controla tanto la temperatura de la reacción como el tiempo necesario para cada uno de los pasos de cada ciclo. Después de la amplificación, el producto de la PCR se detecta mediante electroforesis en gel o alguna de las técnicas de hibridación (p. ej., transferencia Southern Blot). En el caso de la PCR a tiempo real, los productos de la reacción se van detectando por fluorescencia a medida que se van sintetizando, ya sea mediante el empleo de agentes intercalantes inespecíficos como el SYBR-Green o mediante el empleo de sondas de hidrólisis marcadas con diferentes fluorocromos, como las sondas TaqMan® (Costa, 2004; Storch y Wang, 2013; Lennette, 2017).

La PCR tiene tres ventajas principales: a) detecta la presencia de los ácidos nucleicos del virus, b) es una técnica extremadamente sensible, pudiendo llegar a detectar <10 copias del ácido nucleico diana (Jackson *et al.*, 1996; Bloom *et al.*, 1997; Storch y Wang, 2013) y c) con la qPCR, también denominada cuantitativa (PCR a tiempo real), se puede estimar la carga viral siempre y cuando la toma de muestras esté estandarizada (Lennette, 2017). Una ventaja adicional de la PCR es que permite la subsiguiente secuenciación del fragmento amplificado y su uso posterior para diversos fines, como la construcción de árboles filogenéticos (Storch y Wang, 2013; Lennette, 2017). Sin embargo, también presenta algunos inconvenientes:

- a) El método es tan sensible que la contaminación durante la toma de muestras o en el laboratorio puede producirse fácilmente y conducir a un falso resultado positivo; sin embargo, este inconveniente se minimiza en la qPCR debido a que la amplificación y detección se producen en un mismo tubo, que permanece sellado durante todo el proceso, por lo que las posibilidades de contaminación quedan limitadas a la toma y procesamiento de las muestras (Lennette, 2017).
- b) Su extrema sensibilidad plantea en ocasiones dudas sobre la significación clínica de los resultados positivos (Storch y Wang, 2013; Lennette, 2017).
- c) Los componentes de la matriz que constituye la muestra (heces, sangre, leche...) puede inhibir las enzimas en las que se basa el ensayo (Lennette, 2017).

Aunque se ha implementado y validado una PCR para la detección de visones infectados por el AMDV en campañas de control y erradicación, obteniéndose unas Se y Sp similares a las del CIEP (94,7 y 97,9% respectivamente) (Jensen *et al.*, 2011), su aplicación para este fin ha sido descartada debido a que tanto la viremia como la excreción en heces, secreción nasal y saliva es intermitente e impredecible a lo largo del prolongado periodo de persistencia del virus en el organismo (Jackson *et al.*, 1992; Jackson *et al.*, 1996; Bloom *et al.*, 1997; Cepica

and Iwamoto, 2012; Jensen *et al.*, 2014; Farid *et al.*, 2015; Farid y Hussain, 2019). El ADN vírico puede detectarse también en diversos órganos internos, como bazo, linfonodo mesentérico (LNM), hígado, riñón, intestino, médula ósea, pulmón y encéfalo. No obstante, los resultados obtenidos dependen del órgano elegido, el tiempo post-infección y otros factores no determinados, siendo los resultados más constantes y fiables los obtenidos a partir de bazo y LNM, por lo que dichos órganos, específicamente el bazo o la combinación de bazo y LNM, son de elección para el diagnóstico de confirmación de la infección o la obtención de ADN vírico para secuenciación. Para un mayor rendimiento y por razones económicas, el bazo debería ser el primer órgano de elección para la detección del AMDV en tejidos con fines de diagnóstico *post-mortem*, mientras el LNM podría ser utilizado en un análisis adicional ya que solamente mejora la sensibilidad de forma marginal, desde un 90,8% a un 94,7% (Jensen *et al.*, 2011).

Se han ensayado también otras técnicas de detección del ADN vírico tales como amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP: loop-mediated isothermal amplification), que al ser una reacción isotérmica no necesita termociclador y puede realizarse incluso en condiciones de campo. Recientemente se ha puesto a punto una técnica LAMP para el diagnóstico de la AD, obteniendo una Se del 85,7% respecto a la PCR (Zhang *et al.*, 2015). Otra nueva técnica molecular es la secuenciación de próxima generación (NGS: next generation sequencing) (Hagberg *et al.*, 2016b), con aplicación en estudios filogenéticos del genoma completo.

#### 1.6.2.2. Técnicas indirectas

La respuesta inmune tras la infección por el AMDV es el factor clave de la enfermedad, lo que se ve reflejado en la producción de anticuerpos específicos frente al virus y en el incremento del nivel de inmunoglobulinas (HGG), por lo que las técnicas de diagnóstico se han basado tradicionalmente en la respuesta inmune tanto específica como inespecífica.

##### 1.6.2.2.1. Detección de alteraciones del perfil de proteínas séricas

El suero de visón con AD progresiva se caracteriza por una mayor cantidad de proteínas totales, una mayor proporción de gammaglobulinas (GG) y una menor proporción de albúmina (Henson *et al.*, 1962c; An y Ingram, 1977; Cepica *et al.*, 2012). El nivel de GG en suero/plasma de visón sano es de alrededor del 13% de la proteína total (Porter y Dixon, 1966; An y Ingram, 1977; revisado por Andersson, 2017), considerándose que por encima del 21% existe HGG asociada a la AD (Henson *et al.*, 1962c; An y Ingram, 1977; Cepica *et al.*, 2012).

A principios de los 60 se comenzó a utilizar el test de yodo (IAT: iodine agglutination test) para diagnosticar la HGG asociada a la forma progresiva de la AD y de este modo poder eliminar como reproductores a los animales susceptibles al desarrollo de la enfermedad. El reactivo del test reacciona con las GG del suero produciendo un precipitado que puede leerse a simple vista (Mallén *et al.*, 1950; Henson *et al.*, 1962a). El test no es específico frente a la AD, ya que la HGG no es exclusiva a esta enfermedad (los abscesos o la pododermatitis, por ejemplo, producen también HGG); sin embargo, este método resulta eficaz en el contexto de

cabañas con infección endémica debido a la marginalidad que en dicho contexto representan otras posibles casusas de HGG (Gorham, 2000; Cepica *et al.*, 2012). Aunque el test sólo detecta entre el 16-65% de los animales con anticuerpos frente a la AD (revisado por Porter *et al.*, 1980), se trata de un sistema rápido, sencillo y barato, que puede ser realizado por el granjero en la propia explotación. Este test ha sido usado extensamente para reducir la morbilidad y mortalidad asociadas a la infección por el AMDV, así como sus efectos negativos sobre la reproducción y calidad del pelo, y todavía es utilizado en la actualidad con este fin en muchas granjas infectadas. Se ha estimado que el test da resultado positivo con niveles de GG  $\geq 2$  g/100 ml de suero o cocientes albúmina/globulina (A/G)  $\leq 1$  (Gorham *et al.*, 1965, 1976; Gorham, 2000; Cepica *et al.*, 2012; Andersson, 2017).

La alteración de las proteínas séricas propia de la enfermedad puede ser detectada de forma más específica mediante electroforesis (Porter *et al.*, 1980) o MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight) (Cepica *et al.*, 2012). El cálculo del cociente albúmina:gammaglobulinas (A:GG) realizado mediante la técnica MALDI-TOF incrementa la sensibilidad a las alteraciones del patrón de proteínas séricas al combinar dos parámetros que están inversamente relacionados entre sí en virtud de los mecanismos homeostáticos, de tal manera que la albúmina desciende al aumentar las GG y la determinación del cociente entre ambos valores es sensible a cambios más sutiles en las proteínas séricas que los detectados por los test IAT y ELISA; los cocientes A:GG  $< 5$  están asociados al desarrollo de la enfermedad, mientras que cocientes A:GG  $> 8$  se corresponden con animales sanos (Cepica *et al.*, 2012; Cepica, 2016). Sin embargo, el empleo de estas técnicas se ve condicionado por el hecho de que tanto la electroforesis como el MALDI-TOF son métodos caros, laboriosos y técnicamente exigentes (Andersson, 2017). Otro método prometedor es la determinación de proteínas totales mediante espectrometría ultravioleta a 280 nm, que presenta una alta correlación con el MALDI-TOF ( $r = -0,943$ ) y es susceptible de poder ser utilizado directamente en granja, aunque de momento no existen suficientes estudios que avalen su uso (Cepica, 2016).

#### 1.6.2.2.2. El test CIEP

Cho y Ingram (1972) pusieron a punto una técnica de inmunoelectroforesis para detectar anticuerpos específicos frente al AMDV en 1972, el test CIEP (counter-current immunoelectrophoresis; inmunoelectroforesis a contracorriente). Seis años después se describió su aplicación en la erradicación de la enfermedad (Cho y Greenfield, 1978). Desde entonces el test CIEP ha sido utilizado masivamente para la vigilancia epidemiológica y las campañas de control y erradicación de la enfermedad en todos los países productores de visón debido su simplicidad y bajo coste. El antígeno utilizado inicialmente era el virus completo propagado en el visón, el cual se encuentra en forma de inmunocomplejos, por lo que debe ser previamente “activado” mediante distintos tratamientos (Porter *et al.*, 1965; Cho y Ingram, 1973, 1974; Aasted, 1980, 1985; Hahn, 1984). A principios de la década de 1980 se introdujo el antígeno viral derivado del cultivo celular, a pesar de que su rendimiento parece inferior al del antígeno obtenido *in vivo* (Aasted y Cohn, 1982; Farid, 2018). Más recientemente, Knuuttila *et al.* (2009a) han ensayado con éxito un test CIEP con antígeno basado en la



proteína VP2 recombinante, con una Se y Sp del 100% respecto al antígeno obtenido por cultivo celular.

El test CIEP se realiza a partir de plasma obtenido de sangre extraída mediante el corte de una uña y recogida en un capilar heparinizado (figura 14.A y 14.B). A continuación, se realiza una electroforesis sobre un gel de agarosa, con el antígeno en el lado del cátodo y la muestra de plasma en el polo opuesto (Cho e Ingram, 1972). Cuando se aplica el voltaje eléctrico, el antígeno cargado negativamente se moverá hacia el ánodo (figura 14.C). Si la muestra de plasma contiene anticuerpos anti-AMDV, que están cargados positivamente, se moverán hacia el cátodo y se encontrarán con el antígeno en su camino; en presencia de anticuerpos específicos, se formará una línea de precipitado entre ambos pocillos y los resultados pueden leerse a los 30 minutos como una línea blanca de precipitado en el gel de agarosa (figura 14.D) (Hansen, 1988).

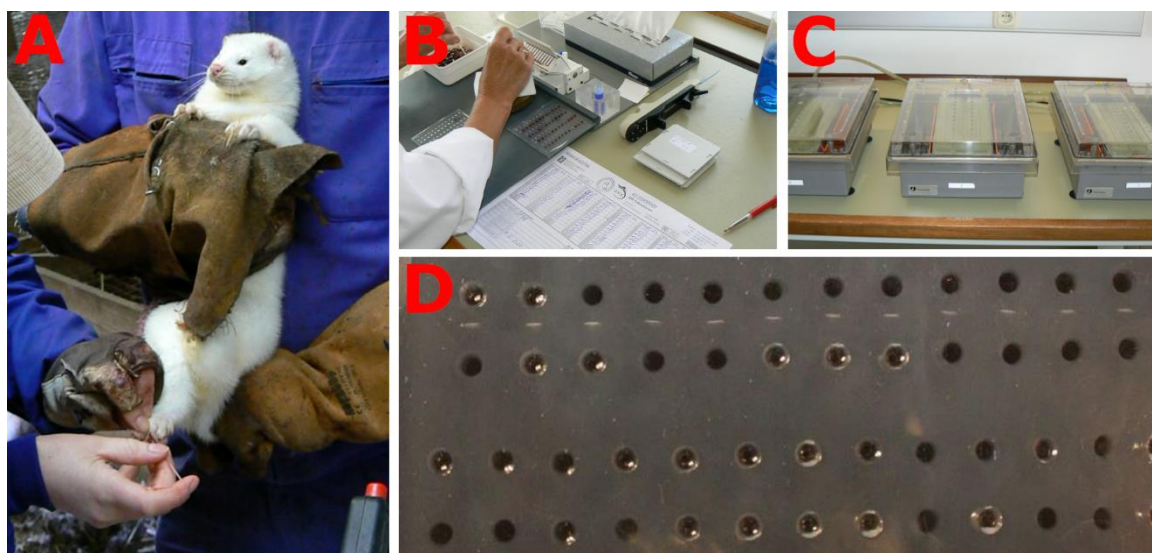


Figura 14. a) Test CIEP. Extracción de sangre de una uña (tubos capilares). b) Depósito del plasma en los pocillos del gel tras la centrifugación; cada pocillo con plasma está enfrentado a otro con antígeno; los pocillos del antígeno se alinean del lado del cátodo y los sueros a testar del lado del ánodo. c) Electroforesis a contracorriente; el antígeno, cargado negativamente, se moverá en dirección al ánodo y los anticuerpos, cargados positivamente, se moverán en dirección opuesta. d) La reacción positiva se lee como una línea de precipitado situada entre ambos pocillos.

Aunque el test CIEP ha estado en uso durante varias décadas, no se han publicado estudios de validación exhaustivos (por ejemplo, de acuerdo con los estándares de la OIE). Las estimaciones de la sensibilidad (Se) oscilan entre 79-99% y la de la especificidad (Sp) entre 90-100% (Wright y Wilkie, 1982; Jensen *et al.*, 2011; Dam-Tuxen *et al.*, 2014; revisado por Knuutila, 2015). Hansen, (1988), en Dinamarca, estimó una Sp del 99,9% y un valor predictivo positivo (VPP) de 0,71 en granjas calificadas como libres de la enfermedad; no obstante, el autor manifiesta las dificultades inherentes al test para establecer la sensibilidad, y entiende que en tanto que ésta no esté dilucidada debe considerarse el total de la granja como unidad testada, así como su histórico de test anuales. Se ha demostrado que la vacunación, fundamentalmente la revacunación frente a enteritis vírica, puede producir resultados

positivos al test CIEP (y a una variante mas sensible del mismo, el CIEP en línea de absorción), por lo que se recomienda no realizar la toma de muestras para serología hasta pasadas 3 semanas de la vacunación (Munck, 1990). Por otro lado, la lectura del test es realizada mediante la interpretación directa de un operario, que se ve influido por factores como haber encontrado o no más reacciones positivas en esa misma granja, y por tanto no puede ser considerado como un test objetivo (Dam-Tuxen *et al.*, 2014). Otros estudios indican que el CIEP proporciona títulos más bajos que muchos otros métodos serológicos y no identifica niveles bajos de anticuerpos durante las primeras etapas de una infección (revisado por Knuuttila, 2015). Aunque el periodo de seroconversión puede ser tan corto como 7 días (Cho y Ingram, 1972; De Geus *et al.*, 1996), varía notablemente y parece depender de la dosis infectante (De Geus *et al.*, 1996; Farid y Hussain, 2020) y de la vía de infección, pudiendo alargarse más de 56 días en animales infectados experimentalmente por vía intranasal sin sedación previa (Farid y Hussain, 2019). Además, el periodo de seroconversión también se ve afectado por la cepa de AMDV y el tipo de visón; así, Aasted *et al.* (1984a) encontraron que se necesitaba un mes para la seroconversión después de la infección del visón de tipo salvaje con una cepa danesa de AMDV. En otros estudios realizados con cepas de alta virulencia, los anticuerpos fueron generalmente detectables entre 5-10 días después de la infección experimental del visón Sapphire con la cepa Utah-1 (Bloom *et al.*, 1994) y en el visón Standard-Black con AMDV-K (Alexandersen *et al.*, 1987).

Cuando la infección experimental se realiza por métodos no invasivos (inoculación intranasal) y a dosis bajas (Farid y Hussain, 2020), o mediante el apareamiento de machos negativos con hembras positivas (Aasted y Hauch, 1988), siendo ambas situaciones más similares a las que se dan en condiciones naturales de transmisión horizontal en granja, los resultados del test CIEP muestran aún una mayor incertidumbre. Así, cuando la infección se realiza por vía intranasal y bajas dosis infectivas la seroconversión puede retrasarse más de 196 días, si bien en este caso no es posible saber si se trata de una infección primaria o secundaria producida durante el periodo de experimentación (Farid y Hussain, 2020). Otro aspecto notable es que, en aquellos casos en los que se produce una infección inaparente, los resultados positivos pueden revertir a negativos o inconcluyentes debido probablemente al descenso en el título de anticuerpos, lo cual, según sugieren los propios autores, podría ser debido a infecciones no persistentes (An y Ingram, 1978; Aasted y Hauch, 1988).

En España, a lo largo de las dos últimas décadas, desde que la confirmación de positivos/inconcluyentes aislados se incorporó al programa sanitario de la ADSG-AGAVI (lo que conlleva también el retestaje de sus vecinos), se ha observado, al inicio de brotes (cuando la prevalencia es aún muy baja), la frecuente reversión de resultados positivos a negativos o inconcluyentes y viceversa en el breve periodo que media entre ambas tomas de muestras, generalmente inferior a 7 días (datos propios propios no publicados).



#### 1.6.2.2.3. Otros test serológicos basados en electroforesis

A lo largo de los años se han desarrollado otros test para tratar de mejorar la sensibilidad y/o especificidad del CIEP. Muchos de ellos son modificaciones del propio test CIEP, como el CIEP modificado (Crawford *et al.*, 1977), la inhibición de la precipitación, también llamado CIEP indirecto (Aasted y Cohn, 1982), el CIEP en línea de absorción (CCLAIE: counter-current line absorption immunoelectrophoresis) y sus modificaciones (Alexandersen *et al.*, 1985a; Aasted *et al.*, 1986), el CIEP aditivo (Uttenthal, 1992) y la “rocket line immunoelectrophoresis” (Alexandersen y Hau, 1985). Por ejemplo, el CIEP indirecto es 32 veces más sensible que el CIEP y su lectura da lugar a menos errores de interpretación, pero requiere de dos reactivos: el antígeno y un suero anti-AMDV (Aasted y Cohn, 1982). De todos ellos, se considera que el más sensible es el CCLAIE (Aasted *et al.*, 1986). Sin embargo, debido a su alto coste y/o consumo de tiempo, todos estos test han sido utilizados sólo como pruebas de confirmación, diagnósticos individuales o con fines de investigación (revisado por Knuuttila, 2015).

#### 1.6.2.2.4. ELISA

Los test ELISA para detectar y cuantificar anticuerpos frente al AMDV se han desarrollado más recientemente, tanto con fines diagnósticos para su empleo en campañas de control y erradicación (Knuuttila *et al.*, 2009; Dam-Tuxen *et al.*, 2014; Knuuttila *et al.*, 2014; Knuuttila, 2015) como también para obtener una estimación indirecta del grado de HGG en animales infectados, con el fin de determinar la respuesta a la infección y seleccionar cabañas por resistencia/tolerancia (Wright y Wilkie, 1982; Andersson y Wallgren, 2013; Andersson *et al.*, 2015, 2017; Andersson, 2017). Los ELISA tienen la ventaja sobre el test CIEP de que son a la vez cualitativos y cuantitativos sin necesidad de ningún paso de dilución intermedia, y por esta última razón se han postulado como sistema de detección de animales resistentes/tolerantes en granjas con infección endémica (Andersson, 2017), además de por su capacidad para poder automatizarse (Dam-Tuxen *et al.*, 2014; Knuuttila *et al.*, 2014; Andersson *et al.*, 2015). El ELISA desarrollado en Dinamarca utiliza como antígeno el AMDV-G obtenido en cultivo celular, presentando una Se del 85,91-90,70% ( $\bar{x}$  = 88,40%) y una Sp del 99,20-99,79% ( $\bar{x}$  = 99,53%) (Dam-Tuxen *et al.*, 2014). En cambio, el ELISA desarrollado en Finlandia por Knuuttila *et al.* (2009a) está basado en la proteína VP2 recombinante, y presenta una Se y Sp del 99 y 97% respectivamente. La automatización de este test utilizando muestras de sangre desecada sobre papel secante presenta una Se y Sp del 96,2 y 98,4% respectivamente (Knuuttila *et al.*, 2014).

#### 1.6.2.3. Consideraciones a tener en cuenta en el empleo combinado de técnicas directas e indirectas

Jensen *et al.* (2011) observaron una congruencia en los resultados obtenidos por PCR y CIEP en el 94,7% entre de los animales estudiados. Sin embargo, se han descrito diferentes causas que pueden dar lugar a que se obtengan resultados discordantes entre ambas técnicas:

- Muestras CIEP positivo y PCR negativo (Dam-Tuxen *et al.*, 2014). Este hecho puede ser debido a:

- Eliminación intermitente del virus en el fluido corporal estudiado (sangre, heces, saliva). Se ha comprobado en estudios experimentales que hay visones que pueden ser seropositivos (CIEP positivo), pero se mantienen o bien con un resultado negativo en la PCR o bien con resultados positivos en la PCR pero de forma intermitente (Jackson *et al.*, 1996b; Oie *et al.*, 1996).
- Se ha observado que hasta el 25% de los visones Pastel infectados por el AMDV (cepa Pullman, baja virulencia) pueden eliminar la infección y tener bajos niveles de anticuerpos (Larsen y Porter, 1975).
- Carga vírica inferior al umbral de detección de la PCR.
- Resultado falso positivo en la técnica CIEP. Sin embargo, esta posibilidad se considera baja ya que la especificidad del test CIEP es muy elevada.
- Muestras CIEP negativo y PCR positivo. Pueden ser debidas a varios motivos:
  - El animal puede haber sido testado en una fase temprana de la infección, en la que todavía no se han desarrollado anticuerpos. Aunque se pueden detectar anticuerpos a partir de los 5-7 dpi, en muchos animales la respuesta inmunitaria no es generalmente detectable en los primeros 10 dpi. Así, Farid *et al.* (2015) encontraron que el porcentaje de animales seropositivos al CIEP a los 10 dpi fue de tan sólo el 39,3%, en tanto que el ADN vírico pudo ser detectado por PCR en órganos internos de todos los animales en dicho momento post-infección.
  - También se han observado diferencias entre animales y entre variedades de visón y cepa implicada (Farid *et al.*, 2015), llegando a no observarse anticuerpos hasta las 3-4 semanas en algunos casos (Hadlow *et al.*, 1985; Jensen *et al.*, 2014). Incluso se ha detectado ausencia de reacción positiva al CIEP a los 56 dpi (inoculación vía oral o intranasal) pese a presentar ADN vírico en órganos internos en ese momento post-infección (Farid y Hussain, 2019); sin embargo, la viremia se produce antes, sobre las 1-3 spi (Jensen y col., 2014).
  - Es posible que se produzca una contaminación de la muestra para PCR o alteración de la muestra de suero (hemólisis, descomposición avanzada del animal).

## 1.7. TRATAMIENTO, PREVENCIÓN, CONTROL Y ERRADICACIÓN

### 1.7.1. Tratamiento y profilaxis vacunal

No existe ningún tratamiento efectivo frente a la forma clásica de la AD (Knuuttila, 2015; Andersson, 2017; Kowalczyk *et al.*, 2019a); no obstante, se han probado diferentes moduladores, orientados más al estudio de la patogenia que al tratamiento propiamente dicho (Cheema *et al.*, 1972; Porter *et al.*, 1972); así como fármacos orientados a mitigar los efectos de la enfermedad (Ellis, 1996; Kowalczyk *et al.*, 2019a).

#### 1.7.1.1. Modulación inmunológica

La forma aguda de la enfermedad, la neumonía intersticial en crías recién nacidas, puede prevenirse mediante la administración de anticuerpos, tanto de forma natural (a través del calostro de madres infectadas) como experimentalmente (a través de la administración de anticuerpos homólogos o heterólogos) (Alexandersen, 1986; Alexandersen *et al.*, 1989).

El uso de algunos fármacos moduladores ha sido también investigado como una alternativa para mitigar el curso de la enfermedad clásica y/o el estudio de su patogenia. Por ejemplo, al administrar ciclofosfamida simultáneamente a la infección experimental de visones de genotipo aleutiano, manteniendo el tratamiento durante un periodo de 13-16 semanas, se inhibió el desarrollo de la HGG y las lesiones características de la AD aunque los títulos víricos no se vieron afectados; sin embargo, la HGG y el cuadro lesional típico de la AD se iniciaron a las 2-3 semanas de terminado el tratamiento, por lo que no parece que se desarrolle tolerancia al virus (Cheema *et al.*, 1972). La administración pasiva de anticuerpos anti-AMDV en el pico de replicación viral produjo lesiones inflamatorias necrotizantes agudas, seguidas de infiltrados de células mononucleares (Porter *et al.*, 1972). Otro fármaco que ha sido probado es el ácido poliinosínico-policitidílico (Poly I-C) —un análogo sintético del ARN de doble cadena utilizado como estimulante inmunitario capaz de inducir la síntesis de IFN- $\gamma$ — mediante su administración en visones de genotipos aleutianos tras la infección experimental con AMDV, y aunque los niveles de GG en el grupo experimental fueron significativamente menores a las 6 spi, dichas diferencias desaparecieron a las 12 spi (Russell *et al.*, 1975).

Se han ensayado también diferentes sustancias moduladoras/estimuladoras de la inmunidad, estudiando su efecto sobre la productividad global de cabañas infectadas. Así por ejemplo, se ha postulado que la melatonina, administrada en implantes subcutáneos de liberación lenta, reduce la mortalidad entre animales infectados por el AMDV gracias a su capacidad antioxidante y de modulación de la respuesta inmune (Ellis, 1996). Más recientemente se ha probado un tratamiento a base de methisoprinol —un inmunoestimulador— con el cual se ha obtenido un incremento del peso al sacrificio y la reducción en una unidad logarítmica de la carga vírica en el tejido linfoide (bazo y linfonodos) (Kowalczyk *et al.*, 2019a).

#### 1.7.1.2. Vacunación

La vacunación con virus inactivado completo o con la proteína de la cápside no sólo no protege de la infección, sino que incrementa la severidad de las lesiones una vez se produce

ésta (Porter *et al.*, 1972; Aasted *et al.*, 1998). Sin embargo, la vacunación con la proteína no estructural NS1 no impide la infección pero confiere cierto grado de protección, induciendo un desarrollo más benigno de la enfermedad (Aasted *et al.*, 1998; Aasted, 2000). La vacunación con el gen NS1 seguida de una segunda dosis de dicho gen más la proteína NS1 indujo la producción temprana de anticuerpos y creó una respuesta de memoria inmunitaria basada en células CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$ , lo cual se tradujo en unos niveles de HGG 10 puntos por debajo del grupo control y una menor mortalidad (Castelruiz *et al.*, 2005). Además, una ventaja de las potenciales vacunas basadas en el gen y/o la proteína NS1 es que no producen anticuerpos frente a la proteína capsular, y por lo tanto no interfieren con los test serológicos empleados en las campañas de control y erradicación (Aasted, 2000). También se han realizado ensayos de vacunas diseñadas en base al genoma completo del AMDV truncado en determinadas regiones del gen VP2, así como otras basadas únicamente en el gen NS1 o VP2 ya fuesen completos o truncados, obteniéndose con una de ellas —en concreto con la vacuna basada en el genoma completo con delección del área codificante de los residuos de aminoácidos 428-466 del gen VP2— una protección parcial frente al desarrollo de la enfermedad, pero no frente a la infección (Liu *et al.*, 2018). Es de resaltar que los aminoácidos ausentes en dicha vacuna han sido previamente identificados como pertenecientes a una región clave de la cápside, implicada en la formación de IC, el ADE y la neutralización de la infectividad *in vitro* (Bloom *et al.*, 2001).

### 1.7.2. Prevención, erradicación y control de la enfermedad

Thrusfield (2007) define “control” de una enfermedad como las medidas encaminadas a reducir la morbilidad y mortalidad, lo que contempla básicamente el tratamiento y la prevención. Sin embargo, para el término “erradicación” este autor da cuatro acepciones diferentes, de las cuales la más común en medicina veterinaria se refiere a la extinción de un agente infeccioso en una determinada área o región. Además, define un tercer término intermedio entre los dos anteriores, la “eliminación”, que consistiría en la reducción de la incidencia de una enfermedad infecciosa a un nivel en el cual se producen pocos o ningún nuevo caso de la enfermedad, aunque el agente infeccioso puede aún persistir. Dado que las estrategias de control de una enfermedad implican un empleo continuo de recursos, éstas resultan económicamente más gravosas que las estrategias de erradicación siempre y cuando se trate de enfermedades en las que dicha erradicación resulta biológica y económicamente posible, ya que el empleo de recursos está limitado en el tiempo.

En el caso del AMDV, tanto el control como la erradicación pueden resultar efectivos desde el punto de vista de la economía de las granjas. Así, aunque algunas granjas se ven abocadas a cerrar debido a las fuertes pérdidas económicas originadas por la AD, otras logran manejar la situación para seguir operando en presencia de la enfermedad (Hansen, 1980). Este mismo autor enumera las siguientes razones que justifican, a pesar de ello, la erradicación de la infección de las explotaciones:

- Mejora de los resultados reproductivos.
- Mejor calidad de piel.

- Menor mortalidad de adultos y crías.
- Mayor resistencia frente a otras enfermedades.
- Menor volumen de test anuales necesarios en las granjas no infectadas.

La **erradicación total** del agente infeccioso, incluso a nivel regional o de granja, es improbable que se consiga dada la extrema resistencia del AMDV en el medio ambiente (Cepica y Iwamoto, 2012); por este motivo, el término “erradicación” usado en esta tesis se corresponde más con el concepto de “**eliminación**”, tal y como es definido por Thrusfield, que con el sentido de eliminación total del agente infeccioso en granjas o regiones determinadas (Cho y Greenfield, 1978; Hansen, 1980). El término “**control**” empleado en la presente tesis comprende tanto las estrategias de “test y sacrificio” cuando van encaminadas a mantener una baja prevalencia (Farid *et al.*, 2012), como las medidas dirigidas hacia la selección de animales resistentes/tolerantes en aquellas áreas donde la infección es endémica (Andersson, 2017).

#### 1.7.2.1. Prevención

Debido a las características intrínsecas del virus y la enfermedad, tales como la alta resistencia ambiental del agente (Eklund *et al.*, 1968; Hahn *et al.*, 1977), la ausencia de anticuerpos neutralizantes (An *et al.*, 1978), el desarrollo de infecciones persistentes y la ausencia de signos clínicos de la enfermedad hasta las ocho o más semanas tras la infección (Porter *et al.*, 1980), las granjas que han logrado erradicar la enfermedad o que nunca la han padecido deben implementar una serie de medidas encaminadas a evitar la entrada del virus en la explotación o la reinfección de los animales a partir del reservorio ambiental presumiblemente presente en las granjas que han pasado por un proceso de erradicación (Hansen, 1985).

Las medidas de prevención se basan en:

1. Bioseguridad:
  - a. Utilización correcta de EPI para todos los visitantes (Knuuttila, 2015).
  - b. Medidas de cierre perimetral y control de accesos que evite o minimice el riesgo de entrada de fauna silvestre en la explotación (Nituch *et al.*, 2011; Farid *et al.*, 2012).
  - c. Medidas preventivas asociadas a los camiones de reparto de pienso, elementos de granja compartidos y entrada de animales vivos (Chriél, 2000a; Espregueira Themudo *et al.*, 2011, 2012).
2. Sistema de certificación del estado sanitario de las explotaciones y publicidad del mismo, para así obtener una garantía básica en la compra e intercambio de animales y material de granja (Hansen, 1985).
3. Evaluación continua de los riesgos asociados al reservorio ambiental de la propia granja (Hansen, 1988).
4. Sistema de serovigilancia permanente estructurada en un programa común a todo el sector y supervisada por los servicios veterinarios de las asociaciones de productores o de las autoridades en sanidad animal (Hansen, 1985, 1988; Espregueira Themudo *et al.*, 2012).



### 1.7.2.2. Estrategias encaminadas a la erradicación

La perpetuación de un virus en la naturaleza depende del mantenimiento de las infecciones en serie, es decir, de una cadena de transmisión donde la aparición de la enfermedad no es necesaria ni necesariamente ventajosa. De hecho, aunque los casos clínicos pueden ser fuentes de virus algo más productivas que las infecciones no aparentes, estas últimas son generalmente más numerosas y más importantes, porque no restringen el movimiento de individuos infecciosos y por lo tanto brindan una mejor oportunidad para la diseminación del virus (Gardner, 2017). El mismo autor considera que hay cuatro vías principales para mantener la cadena de transmisión:

1. El patrón de infección autolimitante aguda, en el que la transmisión siempre se ve afectada por el tamaño y susceptibilidad de la población del huésped.
2. El patrón de infección persistente.
3. El patrón de transmisión vertical.
4. El patrón de transmisión del virus transmitido por artrópodos.

La mayoría de los virus tienen un **mecanismo principal para la supervivencia**; sin embargo, si este mecanismo se interrumpe, por ejemplo, por una disminución repentina de la población hospedadora, puede existir un segundo o incluso un tercer mecanismo como "**respaldo**". La comprensión de estos mecanismos para la perpetuación de un virus es extremadamente valiosa para el diseño e implementación de programas de control (Gardner, 2017).

Clásicamente se ha venido considerando que la principal vía de contagio del AMDV es la vertical (Cho y Greenfield, 1978; Hansen, 1980). No obstante, el virus es capaz de transmitirse eficazmente tanto por vía horizontal como vertical (con variaciones según diversos factores, como la virulencia/infecciosidad de la cepa) (Gorham *et al.*, 1976; Cho y Greenfield, 1978; Larsen *et al.*, 1984; Broll y Alexandersen, 1996), siendo posible también la transmisión por artrópodos pero seguramente con un papel más secundario (Shen *et al.*, 1973; Shen y Gorham, 1973; Gorham *et al.*, 1976; Hartby *et al.*, 2015b). El conjunto de características que presenta el AMDV, tales como la alta resistencia ambiental, la ausencia de inmunidad efectiva, su capacidad para producir infección persistente, su largo periodo de incubación, las múltiples vías de transmisión posibles y sus reservorios en la fauna silvestre, dificultan seriamente su erradicación definitiva (Eklund *et al.*, 1968; Hahn *et al.*, 1977; Porter *et al.*, 1977a; Fournier-Chambrillon *et al.*, 2004; Nituch *et al.*, 2011, 2012; Cepica *et al.*, 2012; Mañas *et al.*, 2016; Parrish, 2016).

**Los mecanismos de “respaldo”** para la transmisión del AMDV podrían explicar la razón por la cual las estrategias de erradicación del AMDV fracasan con relativa frecuencia; por este motivo, dichos mecanismos deben seguir estudiándose con todas las herramientas disponibles incluidas las modernas técnicas moleculares, las cuales ofrecen la oportunidad de enfocar este estudio desde nuevas perspectivas. La revisión de la bibliografía junto con los datos propios basados en el historial de los test serológicos en España sugiere al menos 3 mecanismos de respaldo posibles:



1. **El reservorio ambiental** del virus (Cepica et al., 2012; Cepica, 2016), donde éste puede permanecer viable durante años (Hansen, 1985) y que además resulta difícil de identificar y valorar. Se ha demostrado la identidad de las cepas en rebrotes de la enfermedad respecto a la que había infectado anteriormente la granja (Christensen *et al.*, 2011), lo que los autores imputan a un fallo en los procedimientos de desinfección. Así mismo, es relativamente frecuente que granjas que han erradicado la enfermedad presenten uno o varios reactores positivos o inconcluyentes al test CIEP anual, siendo éste un factor que ha sido asociado con rebrotes de la enfermedad (Chriél, 2000a, 2000b). No obstante, la aparición de positivos aislados puede deberse en algunos casos a fallos en la especificidad del test CIEP, pese a que ésta se considera excepcionalmente alta (Hansen, 1988). En España, aproximadamente la mitad de los brotes registrados entre los años 2012 y 2020 presentaron este tipo de antecedente como único factor de riesgo detectado; para la otra mitad, aunque en algunos casos se dan también estos antecedentes, existen otros factores epidemiológicos ajenos a la explotación que señalan hacia vías de contagio externas, tales como movimiento de animales infectados, compra de instalaciones a granjas positivas o trabajadores compartidos entre granjas positivas y negativas. No obstante, alrededor de dos tercios de las granjas que se han mantenido negativas en dicho periodo muestran también este tipo de incidencias, sin que se hayan llegado a materializar en brotes confirmados (datos propios no publicados).
2. **Vías de transmisión alternativas a la vertical.** Cho y Greenfield, (1978) observaron que la erradicación no era posible en algunas granjas, achacando este fracaso a factores como la mayor virulencia de las cepas. En España hemos observado brotes en los que se experimenta un enorme incremento de la prevalencia en verano/otoño (de menos del 3% en junio a un 30-85% en noviembre), lo que excluye la transmisión vertical como principal vía de contagio (datos propios no publicados). Es posible además que las estrategias de erradicación hayan favorecido la aparición de nuevas cepas con este tipo de adaptación en las granjas, lo que explicaría este tipo de brotes epizooticos en los que la única estrategia de erradicación posible es el sacrificio de todos los animales seguido de una exhaustiva limpieza y desinfección y posterior repoblación con animales no infectados. Una explicación alternativa para este tipo de brotes sería una mayor susceptibilidad de las poblaciones de granja, sometidas a una intensa selección para sus características productivas, y/o el incremento del tamaño medio de las granjas, el cual implica mayores densidades de población.
3. Otro factor a considerar son las **limitaciones intrínsecas y extrínsecas de la detección de animales infectados mediante el test CIEP**, tanto debido a la falta de sensibilidad del test como a las fluctuaciones en el nivel de anticuerpos en animales con infecciones inaparentes, lo que podría dificultar su detección (Cho y Greenfield, 1978; Aasted y Cohn, 1982; Farid *et al.*, 2012, 2015; Farid y Hussain, 2020). Quizá sea necesario plantearse si el test CIEP, de probada eficacia en un contexto de granja infectada, tiene la sensibilidad adecuada para ser usado como único test en el contexto de granjas que han erradicado la enfermedad.

Las estrategias de erradicación de la enfermedad se apoyan en la serovigilancia de la población para determinar la prevalencia e identificar a los animales infectados, un sistema de eliminación de los positivos y protocolos exhaustivos de limpieza y desinfección. El máximo esfuerzo de serovigilancia se realiza en los meses de invierno (diciembre-febrero) con el fin de entrar en el periodo reproductivo (apareamientos, gestación y partos) sin animales positivos. Una vez la granja es negativa, es necesaria la monitorización periódica mediante serología, así como un sistema público de calificación sanitaria de las explotaciones e implementación de medidas de bioseguridad específicas. Las dos estrategias de erradicación posibles son:

1. **La estrategia de “test y sacrificio”:** consiste en realizar una serie de test consecutivos en momentos claves del ciclo productivo, seguidos del sacrificio o segregación de los animales infectados a una zona específica de la granja (zona positiva). Cuando la prevalencia es menor de un 5%, lo habitual es sacrificar en cada ronda de test a todos los animales infectados y a sus vecinos más próximos. Cuando la prevalencia es superior al 5%, lo que suele hacerse es segregar a los positivos y vecinos, manteniendo un área de la granja positiva y otra negativa; en estos casos, todas las operaciones de granja (reparto del pienso, vacunación, etc) se realizan primero en la zona negativa. Los periodos preferentes para realizar el test son:
  - a. Test de invierno: entre uno y tres test entre los meses de diciembre y febrero, con un mínimo de cuatro semanas entre ellos. De este modo se sacrifican o segregar la mayoría de los animales infectados, de modo que se entra en periodo reproductivo con toda la granja, o al menos una zona, con sólo animales negativos.
  - b. Test de mayo-junio: se testan todas las hembras reproductoras para segregar o eliminar a todas aquellas positivas y sus camadas antes de proceder al destete. Una variante del test de junio es la realización de la prueba serológica en mayo sobre las hembras no paridas, que perdieron las crías o que tienen camadas con menos de tres crías (aproximadamente, en condiciones normales, un 15% de la cabaña reproductora). Se basa en el hecho de que una infección durante los apareamientos/gestación producirá mayores tasas de mortalidad fetal/perinatal, abortos y hembras vacías (Broll y Alexandersen, 1996), siendo por lo tanto el grupo de la granja con mayor riesgo. Tiene sentido especialmente cuando se sospecha de una nueva infección, o también para evaluar la evolución de la prevalencia durante el proceso de erradicación.
  - c. Test de octubre/noviembre: puede realizarse sobre una muestra representativa de la granja para conocer la prevalencia y orientar acerca de la estrategia a seguir a partir de ahí. En otros casos se realiza sobre el grupo negativo de la explotación, sobre animales seleccionados previamente por su buen rendimiento productivo, con el fin de construir la cabaña del año siguiente sólo con animales que han dado negativo en este test; posteriormente vuelve a realizarse sobre la cabaña negativa el test de invierno.

Las granjas que siguen esta estrategia deben realizar una cuidadosa desinfección de las jaulas y terreno sobre el que se identificaron animales positivos. Además, se deben

programar con antelación todas las labores de la granja para minimizar la infección de la zona negativa, así como mantener unas medidas de bioseguridad adecuadas y procedimientos de limpieza y desinfección del utillaje de granja y una desinfección anual de toda la instalación. En las granjas de visón, la desinfección completa de toda la granja es una operación que se ve dificultada por el hecho de que no se produce un vacío sanitario completo, tan sólo reducción del censo anual en invierno/primavera a un 20% de la capacidad de la granja; ello obliga a tomar medidas especiales, tales como el apantallamiento, para evitar la difusión de aerosoles cuando se usan las máquinas de limpieza con agua a presión. No obstante, los modernos sistemas de limpieza con espuma activa disponibles hoy en día minimizan el problema de la generación de aerosoles.

2. **La estrategia “*stamping-out*”**: consiste en el sacrificio de todos los animales al final del ciclo productivo, generalmente en noviembre. Una vez despoblada la granja, se inicia un proceso de limpieza y desinfección a fondo de todas las instalaciones, almacenes y otras dependencias, así como del propio terreno de la explotación. La granja se repuebla posteriormente con una cabaña reproductora procedente de una granja negativa, ya sea a finales de febrero, si se realizan los apareamientos en la granja, o bien a mediados de abril, si la repoblación se realiza con hembras a término de gestación. Este sistema presenta la ventaja de permitir acometer la complicada tarea de limpieza y desinfección con la granja vacía; sin embargo, presenta el inconveniente de su alto coste y la posibilidad de que se produzcan rebrotes debido a reservorios no eliminados en la fase de limpieza y desinfección. En este sentido, la evaluación de la eficacia del proceso de desinfección mediante la detección del virus en muestras ambientales, previa a la reentrada de animales, ofrecería una garantía adicional en este proceso. Los test serológicos que se realizan en los meses posteriores a la repoblación son:
  - a. Un control de las hembras sin cría en mayo.
  - b. Un control sobre el 5-10% de los animales en septiembre/noviembre.
  - c. El test anual a todos los reproductores en invierno (exigible a todas las granjas negativas o en proceso de erradicación).

La reaparición de positivos en una granja recién repoblada suele tener como causa una imcompleta limpieza y desinfección, bien de la granja en sí, bien de reservorios tales como los vehículos del personal o material/utensilios diversos procedentes de la etapa anterior. El rebrote al final del proceso tiene una significación diferente según la virulencia/infecciosidad de la cepa de la granja así como la susceptibilidad genética de la nueva cabaña; sin embargo, el pronóstico cuando se producen rebrotes es en general poco favorable, pues aún en el mejor de los casos (cepa poco infecciosa/genotipos resistentes) los rebrotes suelen ser el reflejo no de un foco de contaminación puntual, sino más bien de un fallo generalizado de los protocolos empleados (Christensen *et al.*, 2011).

Las granjas que realizan este proceso se califican como granjas negativas después de un periodo de tiempo variable, según países o regiones, durante el cual todos los test serológicos deben resultar negativos (generalmente después de dos test realizados a toda la cabaña reproductora en un intervalo de 9-18 meses).

#### 1.7.2.2.1. Ejemplos de estrategias de erradicación en diferentes países

**Canadá.** La primera estrategia de erradicación del AMDV fue descrita por Cho y Greenfield (1978) en tres granjas en Canadá. Para ello, se empleó la estrategia de “test y sacrificio” realizando el test CIEP sobre todos los animales de la granja durante el periodo de sacrificio en noviembre y antes del periodo de apareamientos en marzo; esta estrategia, unida a la limpieza y desinfección de las instalaciones, permitió la erradicación del virus en un periodo de cuatro años partiendo de prevalencias de entre el 3,9 y 24,1%. Según los autores, una de las razones para el éxito obtenido sería la preponderancia de la transmisión vertical sobre la horizontal observada en las tres granjas, lo que hace muy efectiva la eliminación de portadores antes del periodo reproductivo. No obstante, los autores hacen referencia a brotes de rápida transmisión y a fallidos intentos de erradicación en otras granjas, sugiriendo que la virulencia de las cepas puede tener una influencia determinante en el éxito de la erradicación mediante este sistema, y apuntando entre otras posibles causas la existencia de defectos en la realización del test CIEP, diferencias en la calidad del antígeno utilizado y la falta de higiene durante la extracción de sangre.

En Nueva Escocia, la provincia con mayor producción de visones en Canadá y zonas de alta concentración de granjas, la utilización del CIEP para erradicar la enfermedad se inició a mediados de 1970. Un amplio análisis de los datos obtenidos en el periodo 1998-2005 demostró el fracaso de la estrategia de “test y sacrificio” en dicha región, aunque sí fue efectiva para reducir la prevalencia (Farid *et al.*, 2012). Entre las razones que podrían estar detrás de este fracaso, los autores citan la falta de una organización que supervise los resultados a nivel provincial y la resistencia de algunos granjeros a permitir el acceso a los resultados del test en sus granjas. Otras causas que se discuten en dicho estudio son:

- I. El carácter esporádico de los test en muchas granjas debido a la falta de programas o regulación al respecto.
- II. La consideración de que una granja es negativa después de tres test sin resultados positivos, sin un programa estructurado de vigilancia posterior (los test realizados por estas granjas suponen sólo el 0,75% del total de test).
- III. La alta concentración de granjas en algunas zonas.

Los autores concluyen que, si el virus no es eliminado de una granja o región tras unos pocos años siguiendo la estrategia de “test y sacrificio”, las probabilidades de eliminación disminuyen drásticamente. En contraposición, el estudio demuestra también que es posible mantener granjas negativas en zonas de alta prevalencia de infección.

En **Dinamarca** diversos estudios han señalado que la transmisión vertical es la vía predominante de contagio dentro de la granja, mientras que la compraventa de animales infectados es el principal vehículo de transmisión entre granjas. El programa de erradicación se inició en Dinamarca en 1976, con un 60% de prevalencia media en las granjas cuando iniciaban el programa. El sistema “test y sacrificio” fue el utilizado en la mayoría de los casos, pero también se utilizó la estrategia de “*stamping-out*”. El programa inicial de

erradicación danés contemplaba seis categorías o niveles de estatus sanitario frente a la infección por AMDV que se denominaban mediante letras, siendo “G” el estatus sanitario más bajo y “A” el más alto (figura 15). En 1988, la mitad de las 1.968 granjas con estatus “A” habían erradicado la enfermedad mediante el sistema de “test y sacrificio” o “*stamping-out*”, mientras la otra mitad lo había hecho reiniciando la actividad en un terreno virgen con animales comprados en granjas negativas, siendo este último el sistema considerado como más seguro para establecer una granja libre de la enfermedad (Hansen, 1980, 1985, 1988). Para subir de categoría, y debido al periodo ventana del test CIEP, era necesario que transcurriesen al menos dos meses para pasar del status “D”/“E” al “C”, y 4-14 meses para pasar del estatus “C” al “B” y del “B” al “A” (Hansen, 1980); además, las granjas A debían testar anualmente a todos los reproductores. Dado las limitaciones de sensibilidad del CIEP, es necesario considerar los resultados de la granja en su conjunto, así como el número de años que la granja ha permanecido libre. Además, aunque la especificidad del test es elevada (99,9%), es necesario implementar un protocolo fiable de retestaje cuando se obtiene un reducido número de positivos en una granja negativa: lavar la placa de electroforesis en una solución salina al 0,9% y, si la reacción positiva permanece, realizar una nueva toma de muestras por parte de personal imparcial y sacrificar a los animales. La sangre es examinada nuevamente mediante el test CIEP o, más frecuentemente, por un test alternativo como la inmunoelectroforesis a contra corriente en línea de absorción (Aasted *et al.*, 1986); además, se realiza también histopatología de hígado y riñón para detectar lesiones compatibles con la enfermedad. En general, alrededor del 50% de estos retestajes son dictaminados como positivos verdaderos (Hansen, 1988).

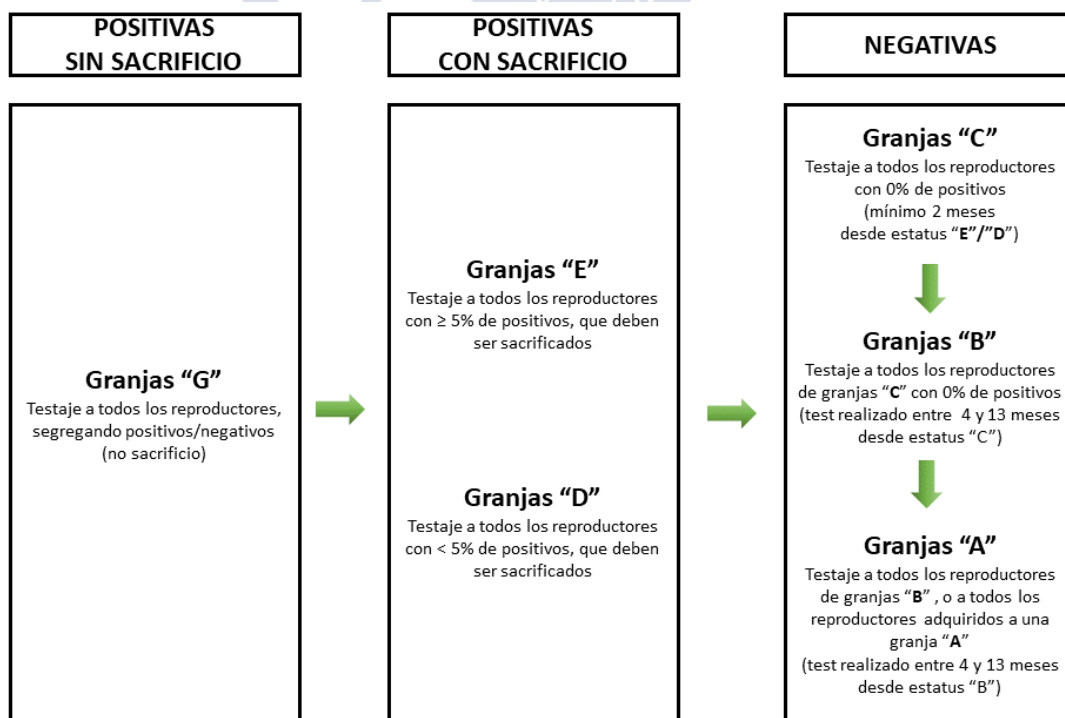


Figura 15. Esquema del sistema de erradicación en granjas danesas hacia 1984 (Hansen, 1985).



Actualmente, la AD está considerada una enfermedad de declara oficial en Dinamarca, existiendo una legislación específica desde 1999 que ha sido revisada varias veces desde entonces; en ese año, el 95% de las 2.300 granjas danesas estaban libres de la enfermedad gracias al esfuerzo continuo de control y erradicación. En general, las granjas libres deben realizar dos muestreos al año, uno en verano (10% de los reproductores) y otro en invierno (20% de los reproductores); si se detectan animales positivos, el granjero está obligado a eliminarlos de la granja antes de la siguiente campaña reproductiva. No obstante, de manera voluntaria algunos granjeros eligen realizar una despoblación total de la granja cuando obtienen resultados positivos, puesto que este procedimiento está subsidiado por la asociación de granjeros. Por otro lado, las granjas negativas localizadas en áreas endémicas tienen que testar a todos los reproductores en invierno. Cuando se producen reacciones positivas en hasta diez animales éstos han de ser retestados, pero los resultados de las nuevas pruebas ya no se utilizan para la clasificación de las granjas sino únicamente con fines pronósticos. Las granjas que presentan más de tres muestras positivas durante una prueba se consideran infectadas, mientras que las granjas con hasta tres muestras positivas se consideran sospechosas. Para que una granja sea declarada libre de la enfermedad debe haber tenido dos test negativos realizados sobre el total de la cabaña reproductora en un intervalo de entre 9 y 18 meses (Chriél, 2000b, 2000a; Espregueira Themudo *et al.*, 2012). Mediante este programa, la erradicación ha sido exitosa en la mayor parte de Dinamarca; sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos, la enfermedad persiste en la región de Vendsyssel, en el norte de Jutlandia (Espregueira Themudo *et al.*, 2011).

En **Finlandia**, aunque no existe legislación sobre el control del AMDV, la enfermedad es de obligada notificación a las autoridades sanitarias. El programa de control y erradicación está organizado por la asociación de granjeros, que facilita a los asociados ayuda técnica y financiera para implementar las medidas de control. Las granjas se categorizan en cinco grupos (A-E) en función de la seroprevalencia (revisado por Knuuttila, 2015):

- Granja A: cero
- Granja B:  $\leq 0,10\%$
- Granja C:  $\leq 0,20\%$
- Granja D:  $\leq 5\%$
- Granja E:  $> 5\%$

**Islandia.** Según Gunnarsson (2001), la AD cumple con los requisitos básicos que hacen que sea factible su erradicación:

- I. La erradicación de la enfermedad debe estar económicamente justificada.
- II. La enfermedad debe tener características que hagan posible la detección y vigilancia.
- III. Debe haber métodos disponibles para interrumpir la transmisión de la enfermedad y la reinfección.

En base a ello, se acometió la erradicación de la AD en el país, donde en 1979 la prevalencia en las pocas granjas que quedaban activas era de entre 85-94%. Para ello se sacrificaron todos los animales, y seguidamente se realizó una exhaustiva limpieza,



desinfección y repoblación con animales negativos. Esta medida se realizó gradualmente entre los años 1982-1984, seguido de un programa de testaje anual en todas las granjas; así, durante los siguientes 12 años no se detectaron animales positivos. Sin embargo, en 1996 se reinfectó una granja, probablemente a partir de visones silvestres. Las medidas que se tomaron fueron el sacrificio de todos los animales y cuarentena de la granja durante 18 meses, realizando además testajes periódicos. También, dada la existencia del reservorio silvestre, se estableció como necesaria la realización de test regulares en todas las granjas como sistema de vigilancia (Gunnarsson, 2001).

**España.** El test CIEP se introdujo en España en 1980, en colaboración con FEUGA (Fundación Empresa Universidad Gallega) y el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela (Juan Varela, comunicación personal, 1997). Se inició entonces un programa encaminado a trabajar con zonas positivas y negativas en las granjas, utilizando la estrategia “test y sacrificio” con dos test anuales (uno en octubre-noviembre y otro en junio) con el fin de ir eliminando paulatinamente la infección. Con esta estrategia se consiguió reducir la prevalencia de la enfermedad, pero en ningún caso erradicarla (datos propios no publicados).

El paso definitivo para la erradicación se dio a finales de los 80 al modificar el calendario de muestreo, realizando así dos o tres test consecutivos de todos los reproductores entre los meses de diciembre y febrero con el fin de entrar en el periodo de reproducción solamente con animales negativos. Posteriormente, a primeros de junio se testaba de nuevo a todas las hembras para detectar nuevas infecciones antes del destete. Cabe señalar que durante este periodo se sustituyeron también los desinfectantes yodóforos por otros basados en aldehídos. En la tabla 11 se muestra la divergente evolución de la prevalencia justo en el año de transición entre uno y otro sistema (ADSG-AGAVI y datos propios no publicados).

**Tabla 11. Evolución de la prevalencia en la zona negativa de una granja con programa de “test y sacrificio” con dos calendarios de testaje diferentes: junio y octubre vs diciembre-febrero-junio**

	JUN-1987	OCT-1987	JUN-1988	OCT-88	DIC-1988	FEB-1989	JUN-1989
MARRÓN	16%	34%	30%	17%	6%	4%	1%
NEGRO	44%	88%	63%	54%	10%	8%	2%

Con este cambio de calendario y de desinfectantes se logró la erradicación en la mayoría de las granjas, a lo que ayudó también el cierre de muchas explotaciones debido a la crisis que afectó al sector entre finales de los 80 e inicios de los 90. Durante los años 90, pese a varios episodios de reinfección en granjas negativas, el balance neto fue el de un porcentaje de granjas negativas superior al 80%. Las reinfecciones ocurridas en este periodo se atribuyen tanto a fuentes internas (reservorios de virus en la explotación) como externas (compra de material o animales infectados, trabajadores provenientes de granjas infectadas). A pesar de esto, se consiguió mantener una sanidad satisfactoria en las granjas mediante el sistema de “test-sacrificio” y, en los casos más difíciles, el sistema “*stamping-out*”. A partir de la entrada en funcionamiento en el 2000 del programa sanitario común mediante la constitución de

AGAVI en ADSG, el programa de control y erradicación de la AD en Galicia y por extensión en el resto de España experimentó un mayor grado de integración y racionalización. El programa desarrolló los siguientes puntos:

1. Test CIEP de toda la cabaña reproductora de granjas negativas, o en proceso de erradicación, entre diciembre y febrero (más de un test en caso de granjas con resultados positivos).
2. Test adicionales en junio y otoño en casos específicos.
3. Centralización de la recepción de resultados en los servicios veterinarios de la Asociación, desde donde se les comunican a las granjas. Esto permite retestar con garantía las reacciones positivas aisladas y asesorar a las granjas desde el momento cero de obtención de resultados.
4. Protocolo normalizado de limpieza y desinfección de instalaciones.
5. Establecimiento de un sistema de calificación de granjas estructurado, transparente y público.
6. Programas comunes de bioseguridad, formación de los productores y asistencia técnica en granja.

El sistema de calificación de granjas se resume en la tabla 12. Con este sistema, la prevalencia de granjas positivas se mantuvo entre el 10 y 15% hasta el año 2011. A partir de ese año se produjeron algunos brotes epizooticos de fulminante propagación y frente a los cuales las granjas afectadas decidieron seguir operando con cabañas positivas, utilizando el test de yodo y/o test ELISA para seleccionar animales resistentes/tolerantes. En el mismo periodo se han producido también infecciones puntuales en algunas granjas, a veces recurrentes durante años consecutivos, pero sin comprometer la sanidad global de la cabaña. El porcentaje de granjas positivas tras la campaña serológica de invierno del año 2019 fue de 22% (8 de 36 granjas) en el conjunto de España (ADSG-AGAVI y datos propios no publicados).

Tabla 12. Sistema de calificación de granjas de la ADSG-AGAVI.

Calificación	Estado/ Situación	Definiciones
<b>Granjas Positivas</b>	<b>Granjas P</b>	Infección endémica. Generalmente realizan selección de animales resistentes/tolerantes mediante IAT o ELISA.
	<b>Granjas G</b>	Las que mantienen animales positivos y negativos en grupos separados. Realizan el test CIEP a todos sus reproductores de la “zona negativa” al menos en febrero y junio.
	<b>Granjas E</b>	Las que testan a todos sus reproductores en diciembre-febrero y obtienen más de un 5% de positivos y los sacrifican de inmediato. Estas granjas tienen que testar de nuevo a todos los reproductores en junio y segregar a las hembras positivas y a su camada.
	<b>Granjas D</b>	Igual que las granjas-E, pero con prevalencias menores del 5%
<b>Granjas negativas</b>	<b>Granjas C</b>	0% de positividad. Este test debe haberse realizado al menos dos meses después del último test con resultados positivos.
	<b>Granjas B</b>	Todos los animales reproductores en una “granja C” no dan ningún resultado positivo en los dos últimos test, separados entre sí por un periodo de 3-13 meses.
	<b>Granjas A</b>	Todos los reproductores en una granja previamente clasificada como “Granja B” o “A” no dan ningún resultado positivo en los dos últimos test, separados entre sí por un periodo de 3-13 meses.
	<b>Granja “Certificada Negativa”</b>	Aquella que estando fuera de la ADSG aporte un certificado veterinario en el que se respalde su estatus negativo y se justifique suficientemente con criterios equivalentes a los de la ADSG.
<b>En suspenso y pendientes</b>	<b>Granjas “?”</b>	“ <i>en suspenso</i> ”. Son aquellas granjas previamente negativas que habiendo realizado el test obligatorio presentan algún tipo de incertidumbre para poder ser certificadas como negativas. También las granjas que inician o reinician actividad con cabaña procedente de una granja negativa certificada, antes de que realicen el primer test completo anual en su explotación.
	<b>Granjas O</b>	“ <i>sin calificar</i> ”. Aquellas que no realizan el test anual obligatorio y de las cuales no hay evidencias o datos que permitan calificarlas como positivas.

#### 1.7.2.2.2. Limitaciones de los actuales programas de erradicación

Son muchos los factores que pueden influir en la persistencia del AMDV y la reaparición de positivos en las granjas que siguen un sistema de erradicación, como la ubicación geográfica, tamaño de la granja, medidas de bioseguridad, transmisibilidad entre granjas, así como presencia de fómites y vectores. Además, deben ser tenidos en cuenta los siguientes factores (Farid *et al.*, 2012):

- I. Las limitaciones intrínsecas y extrínsecas en la sensibilidad del test CIEP en condiciones de infección natural en granja, tanto por la sensibilidad del test en sí como por la variabilidad individual en la producción de anticuerpos específicos detectables.

- II. La persistencia del virus en el ambiente. Su elevada resistencia a los tratamientos físicos y químicos está documentada, pudiendo permanecer infeccioso en el terreno durante considerables periodos de tiempo.
- III. La posible infección a partir de la fauna silvestre.
- IV. La cepa del virus. Algunos autores consideran que es más fácil la erradicación con cepas de baja o media virulencia, aunque no hay evidencias experimentales al respecto.

Algunos autores consideran que las estrategias de erradicación se basan en una falsa premisa: que el principal portador del virus es el animal infectado y no el ambiente contaminado por la masiva eliminación de virus a través de las diferentes excreciones y su acumulación en el terreno y materiales de granja, que se ve además favorecida por su extrema resistencia a las condiciones ambientales. Según su punto de vista, esto podría explicar el fracaso a medio plazo que han tenido los intentos de erradicación en muchas regiones del mundo (Cepica *et al.*, 2012; Cepica, 2016).

Por tanto, el **reservorio ambiental** y la distribución del virus en el ambiente es algo que debe ser estudiado en profundidad para comprender mejor las causas subyacentes al fracaso de los programas de erradicación. Igualmente, la **epidemiología molecular** es fundamental para establecer el origen de los brotes y ayudar a inferir las vías de contagio. Por último, las limitaciones de los actuales **sistemas de diagnóstico** serológico para detectar animales infectados con dosis víricas bajas y/o cepas de baja virulencia deben ser tenidas en cuenta y analizadas en conjunción con el resto de los datos epidemiológicos.

#### 1.7.2.3. Estrategias encaminadas al control de la enfermedad

La variación genética para la resistencia y la tolerancia frente a las enfermedades infecciosas de los animales ha sido revisada y estudiada por Råberg *et al.* (2007). Los autores definen resistencia como la capacidad para limitar la carga del patógeno; en contraposición, tolerancia es la capacidad para limitar los daños originados por dicha carga. Estos autores describen además que ambos caracteres están negativamente correlacionados. Por definición, la resistencia tiene un efecto negativo sobre el patógeno, mientras que la tolerancia no, con las implicaciones que ello tiene para la ecología y evolución de las interacciones entre patógeno y hospedador. Así, por ejemplo, un control más agresivo de la infección por parte del hospedador puede incrementar el daño colateral dando lugar a una inmunopatología. La evolución hacia genotipos resistentes tiene además un efecto negativo sobre la prevalencia del agente infeccioso en la población hospedadora. Generalmente, la relación patógeno/hospedador es considerada como una coevolución antagonística, donde el incremento de resistencia por parte del hospedador conlleva coadaptaciones del patógeno, en un ciclo continuo de no-equilibrio evolutivo. Sin embargo, la tolerancia no conlleva efectos negativos sobre la supervivencia del patógeno, y no alimenta por tanto una coevolución antagonística de éste en la misma medida que cabe esperar de la resistencia.

La tolerancia al AMDV asociada a la infección transplacentaria por AMDV ha sido estudiada por Porter *et al.* (1977b); los autores reflexionan sobre las potenciales repercusiones

epidemiológicas de este hecho, en el sentido de que la tolerancia adquirida cuando se produce la infección por vía vertical no sólo va acompañada de cargas víricas más altas, sino que además prolonga la vida de los animales facilitando la transmisión horizontal en una especie animal que en su estado silvestre tiene un estilo de vida solitario. Por otro lado, la resistencia a la enfermedad parece una característica asociada a la forma inaparente o no progresiva de la AD, donde no sólo las alteraciones características de la enfermedad (HGG, título de anticuerpos y cuadro lesional) están sumamente atenuadas o ausentes, sino donde además la carga vírica se ve seriamente restringida (An y Ingram, 1977, 1978; An *et al.*, 1978). En la actualidad, algunos autores utilizan el término resistencia para aquellos visones que resisten la infección (no receptivos) o son capaces de eliminar el virus del organismo (infección no persistente), mientras que reservan el término tolerancia para aquellos visones que no desarrollan la enfermedad pese a padecer una infección persistente (Farid, 2010, 2018). Otros autores, como Andersson (2017), utilizan el termino resistencia a la AD en un sentido amplio que abarcaría ambos conceptos. En esta tesis hemos adoptado el término “resistencia/tolerancia” para referirnos al carácter fenotípico general de infección (o más exactamente seroconversión) persistente de curso inaparente.

En los países, regiones o granjas en los que la AD es endémica, la lucha contra la enfermedad se centra en el control de la misma mediante la selección de animales resistentes/tolerantes (Andersson *et al.*, 2017). Esta selección se basa en la detección directa o indirecta de la alteración de las proteínas séricas característica de la enfermedad (Gorham *et al.*, 1965; Farid, 2010; Cepica *et al.*, 2012; Cepica, 2016; Andersson, 2017). Entre dichos métodos cabe citar:

- Selección de animales por su rendimiento productivo: tamaño de camada, calidad de piel y ausencia de signos de enfermedad. Es una aproximación obvia que se ha seguido en muchas granjas con resultados aceptables (Farid, 2010).
- La detección de la alteración del perfil de proteínas séricas (HGG y cociente albúmina/globulina):
  - Determinación de las proteínas séricas mediante electroforesis (Porter *et al.*, 1969; Hahn y Hahn, 1983). Es un método útil en investigación, pero no aplicable con fines productivos.
  - Detección de la HGG mediante IAT (Henson *et al.*, 1962a; Gorham *et al.*, 1965). Usado de forma generalizada en los años 60 y 70 del pasado siglo, aún hoy es un método empleado en muchas granjas con infección endémica en todo el mundo.
  - Determinación del cociente albúmina/globulina por MALDI-TOF (Cepica *et al.*, 2012; Cepica, 2016). Es un método aún en desarrollo, más caro y laborioso que el IAT, pero también más sensible.
- Métodos basados en la detección de anticuerpos específicos frente al AMDV:
  - Determinación del título de anticuerpos: mediante el test CIEP pueden detectarse los animales con títulos de anticuerpos más bajos, usando ese marcador como indicador de resistencia/tolerancia (Bloom *et al.*, 1975; Hadlow *et al.*, 1985). No obstante, su coste y laboriosidad no lo hacen adecuado para su uso con fines productivos.

- ELISA cuantitativo: permite medir el título de anticuerpos de forma económica y automatizada y puede aplicarse tanto para la detección de animales infectados como para estimar el grado de tolerancia a la infección a partir del nivel de anticuerpos anti-AMDV (Andersson *et al.*, 2015; Andersson, 2017). Sin embargo, la relación entre el nivel de anticuerpos obtenido mediante ELISA y la progresión real de la enfermedad ha sido puesta en duda debido a que la fracción de anticuerpos asociada a IC no es detectada, como tampoco lo es la fracción de anticuerpos autoinmunes que se desarrolla durante el transcurso de la enfermedad (Cepica *et al.*, 2012; Cepica, 2016).

De todos los test citados, sólo el IAT y el ELISA se usan de forma generalizada, siendo el MALDI-TOF un método aún en experimentación. La aplicación de estas campañas de selección para tolerancia al virus se basa en testar en otoño (antes del sacrificio) a los posibles reproductores del año siguiente (preselección), eliminando a todos aquellos que dan valores positivos. El test puede repetirse a principios de invierno (antes de los apareamientos) para hacer un segundo barrido. De este modo, se consigue reducir la mortalidad y restablecer la productividad a niveles aceptables (Henson *et al.*, 1962a; Gorham *et al.*, 1965; Cepica *et al.*, 2012; Cepica, 2016; Andersson, 2017).

Una limitación común de la selección de animales resistentes/tolerantes es que no todos los animales están infectados, y los que lo están no se han infectado al mismo tiempo ni en las mismas condiciones, ni la enfermedad progresa al mismo ritmo en todos ellos (Desai, 2016). Una forma de soslayar este inconveniente sería la selección asistida por marcadores genéticos para un determinado carácter fenotípico (tolerancia/resistencia) y su posterior detección mediante pruebas genéticas; de hecho, los primeros pasos en esta dirección se están dando ya en la actualidad (Farid *et al.*, 2014; Desai, 2016; Fan *et al.*, 2019). Finalmente, estudios recientes sugieren que puede haber cierto grado de heredabilidad en la susceptibilidad a la infección por el AMDV, aunque con un valor muy bajo (Häkli *et al.*, 2013).

Está por demostrar si la selección en granja de animales por resistencia/tolerancia conlleva cargas ambientales víricas similares o diferentes de las asociadas a los brotes epizooticos o a infecciones endémicas en granjas que no realizan ningún tipo de test. Es un hecho que en las granjas con infección endémica que realizan anualmente el IAT la prevalencia a dicho test se reduce con los años a valores tan bajos como el 5-12% y sin embargo, al menos en algunas de ellas, la prevalencia al test CIEP se mantiene en niveles muy elevados (87 - 92%) (Farid, 2010; datos propios no publicados). También se han detectado cargas virales más bajas en granjas con infección subclínica (dos unidades logarítmicas de diferencia) (Kowalczyk *et al.*, 2018) y una notable reducción de la carga ambiental en granjas positivas tras varios años de infección endémica subsiguiente a un brote epizootico (datos propios no publicados). Todo ello plantea interesantes preguntas sobre la carga vírica y las vías de infección en dichas condiciones; lo que, dadas las implicaciones epidemiológicas que tiene para el conjunto del sector, es un campo que requiere futuros estudios.



## 1.8. DETECCIÓN AMBIENTAL

### 1.8.1. Objetivos de la detección ambiental

La transmisión horizontal indirecta tiene gran importancia en muchas enfermedades infecciosas, ya que muchos patógenos presentan una resistencia ambiental que les permite transmitirse eficazmente a través de diversos fómites. Hasta hace escasamente unas décadas la detección del patógeno únicamente era posible en los propios animales, por lo que el papel de esta forma de transmisión se ha estudiado tradicionalmente mediante modelos experimentales o bien se ha deducido a partir de estudios epidemiológicos que valoraban factores de riesgo asociados a la transmisión indirecta. Sin embargo, la relativamente reciente posibilidad de detección de patógenos en muestras ambientales ha permitido estudiar la transmisión indirecta de las enfermedades infecciosas de una forma más específica.

Los primeros estudios de detección ambiental de patógenos se realizaron en medicina humana y se centraron en ciertas infecciones relacionadas con la protección de la salud pública. Así, en la década de 1960 se realizaron estudios acerca de la contaminación bacteriana ambiental de aguas residuales, lodos de depuradoras y superficies de industrias alimentarias, describiéndose diferentes métodos para la toma de muestras ambientales (Favero *et al.*, 1968). La detección de virus humanos en muestras ambientales comenzó a finales de 1970, principalmente en agua (Bosch, 1998). En sus principios, la detección ambiental de virus estaba basada en cultivos celulares, lo que impedía su aplicación en el caso de ciertos virus de difícil o imposible cultivo, como los norovirus (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012). Sin embargo, la introducción de las nuevas técnicas moleculares a finales de los años 80 permitió el inicio de una nueva era en el estudio de la virología ambiental; estas técnicas, inicialmente la hibridación y posteriormente la PCR, han facilitado la realización de estudios epidemiológicos a partir de muestras ambientales, especialmente en aquellos virus en los que no se ha conseguido su cultivo en laboratorio de forma eficiente (Bosch, 1998).

En los últimos años se ha experimentado un constante incremento en la detección ambiental de virus, tanto en lo que se refiere a los diferentes tipos de virus detectados como a la diversidad de elementos ambientales muestreados. Además de las muestras ya comentadas, como las aguas residuales, se han establecido protocolos para la detección ambiental de virus en superficies y se ha incluido, por ejemplo, la detección de patógenos en muestras de aire (Stetzenbach *et al.*, 2004). También la aparición de nuevas técnicas, como la secuenciación total de los ácidos nucleicos (metagenómica), pueden permitir la determinación de múltiples patógenos a partir de una misma muestra ambiental (Julian y Schwab, 2012). Desde los años 80 se han realizado estudios sobre la detección de virus en fómites, principalmente relacionados con colegios y centros hospitalarios. La monitorización de superficies ha sido crítica para el estudio de la diseminación de virus en hospitales al contribuir a comprender la causa de brotes nosocomiales, ayudando así a establecer medidas de prevención más específicas (Ganime *et al.*, 2015).

En veterinaria, los estudios de epidemiología basados en la detección de patógenos en muestras ambientales han sido mucho más tardíos que en medicina humana. La detección

ambiental de bacterias causantes de enfermedades infecciosas en los animales ha sido utilizada, entre otras, para el diagnóstico a nivel de rebaño de la paratuberculosis (Donat *et al.*, 2015) y en el estudio de la diseminación en el ambiente y en diferentes fómites de los patógenos causantes de la listeriosis, colibacilosis, salmonelosis y campilobacteriosis en aves (Davies y Wray, 1996; Ridley *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2012). En el caso de virus, los diferentes estudios realizados se han centrado en identificar las rutas de transmisión de algunos virus con interés para la salud pública como la influenza aviar (Boone y Gerba, 2005; Neira *et al.*, 2016). Así, se demostró la contaminación ambiental por el virus influenza H5N1 en muestras ambientales de granjas avícolas infectadas, señalando la necesidad de establecer medidas de higiene general, la desinfección de áreas en contacto con animales infectados y el cercado de las granjas para evitar la diseminación de la infección (Vong *et al.*, 2008). Este tipo de estudios también ha permitido establecer la importancia de la transmisión indirecta del virus influenza entre granjas de porcino mediante fómites contaminados (Allerson *et al.*, 2013). También se han realizado estudios en otras enfermedades víricas como el PRRSV, donde se ha podido demostrar la transmisión mediante fómites (Pitkin *et al.*, 2009). Más recientemente se han incluido las muestras de aire en los estudios de detección ambiental, lo que ha permitido demostrar por ejemplo la existencia de diferencias en la transmisión aerógena entre distintos serotipos del virus de la fiebre aftosa (Colenutt *et al.*, 2016), o la posibilidad de transmisión aerógena en el caso del virus influenza A en porcino (Corzo *et al.*, 2013) y peste porcina clásica (Weesendorp *et al.*, 2008). También se ha utilizado la detección de virus en muestras de aire para comparar la excreción del agente entre animales según su nivel de inmunidad; así, se ha demostrado que los cerdos recién destetados, con inmunidad maternal, podían ser fuente de infección de influenza por vía aerógena aunque no presentasen signos clínicos (Corzo *et al.*, 2014). Otra finalidad de este tipo de estudios ha sido valorar la capacidad de diseminación aerógena de diferentes patógenos de interés, como el virus de la diarrea epidémica porcina que puede llegar a detectarse a más de 16 km de una granja infectada (Alonso *et al.*, 2014), o el PRRSV y *Mycoplasma hyopneumoniae* que han sido detectados en muestras de aire a distancias de hasta 4,7 km desde las granjas infectadas (Dee *et al.*, 2009).

La detección de patógenos en muestras ambientales puede tener varios objetivos:

- Estudiar la importancia de las diferentes vías de transmisión de las enfermedades. La utilización de estas técnicas sobre muestras de superficies ha ayudado a explicar las rutas de transmisión de enfermedades como las causadas por norovirus o rinovirus en medicina humana. La utilización de muestras de aire permite principalmente el estudio de la transmisión de enfermedades respiratorias, pero también de otras como las digestivas, ya que pueden producirse aerosoles por vómitos, irrigaciones de agua contaminada, etc. También es una herramienta útil para demostrar la importancia de la transmisión indirecta mediante fómites. Todos estos resultados pueden ser utilizados para evaluar posteriormente el riesgo de exposición a una enfermedad concreta.
- Determinar la eficacia de las medidas que tengan por objeto disminuir el riesgo de transmisión. La detección ambiental de patógenos puede emplearse para evaluar

diferentes protocolos de bioseguridad aplicados en las granjas y en el transporte de animales, así como también para valorar la eficacia de los distintos productos y protocolos de limpieza y desinfección.

- **Sistemas de vigilancia.** El muestreo ambiental tiene varias ventajas en la vigilancia de las enfermedades en granjas en comparación con la toma de muestras biológicas directamente recogidas de los animales, incluyendo la minimización del contacto de los humanos con los animales infectados (en el caso de zoonosis) y del estrés de los animales asociado a su manipulación; siendo también una técnica de muestreo con una buena relación coste/beneficio. Como ejemplo, el empleo de muestras de aire se ha utilizado con resultados satisfactorios como sistema de monitorización del virus de Newcastle en granjas avícolas infectadas (Hietala *et al.*, 2005).
- **Determinar la fuente de origen de la infección.** La información obtenida a partir de los niveles de contaminación de diferentes zonas o elementos de las granjas (utensilios, maquinaria, vehículos...) junto con la caracterización molecular de las cepas detectadas puede ser útil para rastrear el posible origen de los brotes.

### **1.8.2. Limitaciones de la detección ambiental**

A pesar de la utilidad de estos estudios, tenemos que tener en cuenta que la detección ambiental de patógenos presenta varias limitaciones. Una de ellas es la sensibilidad analítica de la técnica, es decir, su límite de detección. En general, los volúmenes de muestra analizados en el caso de las técnicas moleculares como la PCR es mucho menor que los utilizados en otras técnicas como los cultivos celulares, lo que puede llevar a falsos resultados negativos en muestras con baja carga vírica (Rodríguez *et al.*, 2009). Este hecho es importante dado que existen matrices ambientales que con bajas cargas virales (por ejemplo 1-10 partículas virales por litro de agua o gramo de suelo) suponen todavía un riesgo de contagio en algunas enfermedades, como se ha determinado en estudios en humana (Julian y Schwab, 2012). Este inconveniente ha sido repetidamente considerado en algunos tipos de muestras, como es en el caso de las muestras de agua (Rodríguez *et al.*, 2009). Esta limitación se puede mitigar, al menos en parte, utilizando métodos de concentración en muestras líquidas, grandes volúmenes en muestras gaseosas, o un mayor número de muestras y muestreo de superficies más extensas cuando se trata de muestras sólidas y/o superficies (Rodríguez *et al.*, 2009; Larsen, 2013). No obstante, debe tenerse en cuenta que la concentración de la muestra conlleva a menudo no sólo la concentración del patógeno sino también de sustancias inhibitoras de las técnicas de biología molecular (Julian y Schwab, 2012); aunque hay que mencionar que se han desarrollado algunos protocolos de concentración de patógenos que evitan este inconveniente, como por ejemplo los métodos de separación inmunomagnética (Haramoto *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011).

Una segunda limitación de la detección ambiental de patógenos es la presencia de sustancias inhibitoras en las muestras ambientales, algo que puede afectar especialmente a las técnicas de biología molecular como la PCR. Como se ha comentado, este efecto es aún mayor en muestras en las que se realiza concentración, como por ejemplo las muestras de agua. Es de destacar que ya desde el inicio de la aplicación de estas técnicas se establecieron

diferentes procedimientos para la eliminación de los inhibidores presentes en las muestras ambientales (Bosch, 1998), pero sigue siendo una limitación difícil de solucionar por completo dado la gran diversidad de sustancias que pueden actuar como inhibidores, motivo por el cual es crucial la elección de métodos adecuados para la extracción de los ácidos nucleicos según la matriz con la que se vaya a trabajar (Schrader *et al.*, 2012). Existe todavía un gran desconocimiento acerca de estas sustancias inhibidoras y los mecanismos implicados, habiéndose demostrado una gran variabilidad en la inhibición de la PCR incluso en el mismo tipo de muestras, por lo que se considera imprescindible realizar controles internos en cada muestra (Huggett *et al.*, 2008). Los falsos negativos que se producen en la PCR por presencia de inhibidores en la muestra se deben a un amplio abanico de mecanismos, tanto durante los procesos de extracción como de amplificación: interferencia en la lisis de la muestra, degradación de ácidos nucleicos, degradación/inhibición/alteración de las enzimas necesarias, bloqueo del sitio de unión de primers/sondas... (Wilson, 1997; Schrader *et al.*, 2012). Este problema ha sido abordado por diferentes estudios; así, Opel *et al.* (2010) esclarecieron los mecanismos de actuación de algunos inhibidores conocidos de la PCR (calcio, ácidos húmicos, polisacáridos complejos, colágeno, melanina, hematina, nucleasas, restos bacterianos y ácido tánico) mediante la aplicación de diversas concentraciones y el análisis de la amplificación obtenida. Debido a su diversa naturaleza, las muestras de tipo ambiental pueden contener una amplia variedad de inhibidores; entre ellos, cabe destacar la presencia de ácidos húmicos y fulmínicos en muestras de suelo y biomasa en descomposición, que actúan como potentes inhibidores debido a la unión al molde de ADN incluso a bajas concentraciones (Abbaszadegan *et al.*, 1993; Ijzerman *et al.*, 1997; Schrader *et al.*, 2012). Entre los posibles métodos para la eliminación de estas sustancias durante el procesado de la muestra podemos destacar el uso de resinas quelantes como el Sephadex® o el Chelex® (Abbaszadegan *et al.*, 1993) o procesos de diálisis, extracción con solventes y ultrafiltración (Ijzerman *et al.*, 1997). También se han descrito diferentes eficiencias de la PCR en presencia de sustancias húmicas según el tipo de polimerasa empleada en la reacción (Matheson *et al.*, 2014).

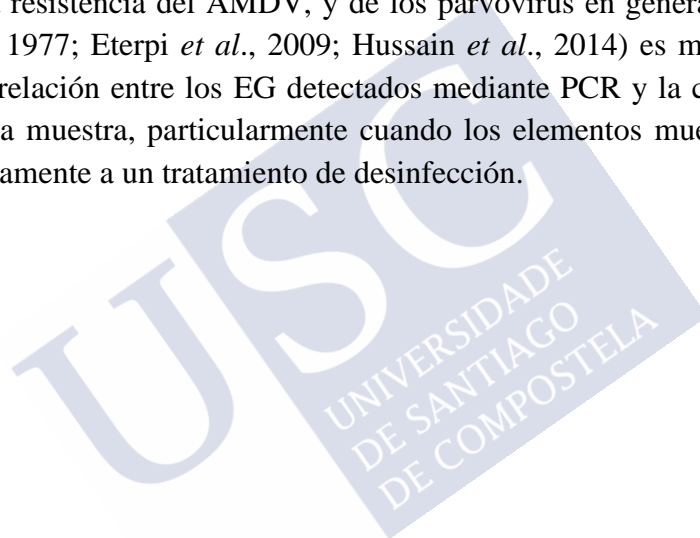
Otra limitación es la interpretación de los resultados obtenidos. En primer lugar, existe una elevada disparidad entre los protocolos empleados para la detección ambiental de patógenos en relación a las unidades utilizadas para la medición, de tal modo que los resultados varían enormemente según se expresen como copias de ADN/ARN por reacción o por cantidad de muestra (hisopo, volumen de agua, peso de la muestra) (Julian y Schwab, 2012). Este problema podría solucionarse mediante la estandarización de los métodos empleados, lo que permitiría a su vez una mejor comparación entre los resultados obtenidos en diferentes estudios; y si bien es cierto que para la detección de patógenos en agua ya se han establecido ciertos estándares, esto no ocurre en el caso de muestras de superficies o de aire (Girones *et al.*, 2010; Julian y Schwab, 2012). En segundo lugar, los resultados deben ser interpretados en su contexto: los resultados negativos deben evaluarse conjuntamente con la epidemiología y teniendo en cuenta la sensibilidad y la información obtenida a partir de los controles internos incorporados en la técnica utilizada, mientras que los resultados positivos han de ser valorados en relación a la epidemiología de la enfermedad y la posibilidad de

contaminación durante la toma de muestras o la realización de la técnica. También deben tenerse en cuenta ciertos aspectos, como que determinados virus patógenos pueden ser detectados tanto en presencia como ausencia de enfermedad en la población estudiada, o que varias cepas del mismo virus pueden estar presentes en el medio ambiente por lo que puede ser necesaria una investigación más profunda para determinar si la cepa detectada es o no realmente la causa del brote en estudio (Julian y Schwab, 2012).

Por último, otro problema inherente a la utilización de la PCR en la detección de patógenos ambientales es que no aporta información acerca de la infectividad del ácido nucleico detectado. Se ha descrito que la ratio entre equivalentes genómicos (EG) detectados mediante técnicas moleculares y partículas realmente infecciosas aumenta con el tiempo, y depende en gran medida de otros factores como las condiciones climáticas y el tipo de virus; por ejemplo, esta relación puede oscilar entre 70:1 a 50.000:1 para enterovirus en aguas superficiales naturales (Rutjes *et al.*, 2005; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012). Por lo tanto, ante un resultado positivo obtenido mediante PCR es imposible discernir si se trata o no de virus infectivo únicamente en base a los resultados de la PCR, lo que afecta tanto a estudios de riesgo como a pruebas de efectividad de procedimientos de desinfección. La infectividad de un virus se define como la capacidad del virus para introducirse en una célula y utilizar sus estructuras para replicarse y producir una progenie de partículas virales infecciosas (Rodríguez *et al.*, 2009); por tanto, para la realización de un análisis de riesgo es necesario conocer el número de partículas virales con capacidad infectiva (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012). Los viriones están formados por dos componentes principales, la cápside (con o sin envoltura) y el genoma; la cápside tiene funciones en la interacción del virus con las células, permitiendo la entrada en éstas y también protege el genoma del virión de las nucleasas y de los factores ambientales (pH, radiación UV, temperatura, humedad), de tal manera que la integridad de dicha cápside es crítica para la capacidad de producir una infección. Así, se sabe que algunos tratamientos como la pasteurización inactiva los virus debido a la desnaturalización de la cápside pero sin producir un daño en el genoma, que sigue siendo detectado por la PCR; por otro lado, algunas técnicas que sí dañan el genoma como la radiación UV pueden también dar lugar a falsos positivos ya que la secuencia diana puede no haberse visto afectada, un hecho que depende también de la longitud de dicha diana (Pecson *et al.*, 2009). Relacionado con esto, una técnica que se ha implementado para intentar establecer la infectividad de los ácidos nucleicos detectados mediante PCR es detectar el genoma intacto, lo que en teoría serviría como indicador de que se encuentra protegido por la cápside (Rodríguez *et al.*, 2009); de hecho, se han llegado a desarrollar modelos matemáticos que pueden ayudar a establecer el tamaño del amplicón necesario para detectar un daño en el genoma con cierta sensibilidad, de tal manera que si el fragmento es suficientemente largo puede considerarse que el genoma permanece íntegro con una probabilidad dada (Pecson *et al.*, 2011). Otro método para verificar la infectividad de las partículas víricas detectadas es la combinación de la qPCR con un tratamiento previo que permita determinar la integridad de la cápside previamente a la extracción y purificación de los ácidos nucleicos (Rodríguez *et al.*, 2009). Dentro de estos sistemas podemos señalar el tratamiento con proteasas y nucleasas, donde si la cápside viral está intacta no se ve afectada por las proteasas y por tanto las nucleasas no pueden degradar



los ácidos nucleicos (Nuanualsuwan y Cliver, 2002; Lamhoujeb *et al.*, 2008). Otro método es el empleo de sustancias colorantes intercalantes como la monoazida de propidio (PMA), que es capaz de introducirse en las cápsides dañadas y unirse a los ácidos nucleicos tras un proceso de fotoactivación, impidiendo así la amplificación de los mismos (Sánchez *et al.*, 2012; Jeong *et al.*, 2017). Por último, otra alternativa utilizada para establecer la infectividad de los virus presentes en una muestra concreta es la utilización conjunta de los cultivos celulares con la PCR: se realiza primero el cultivo de la muestra en cultivos celulares, y el sobrenadante, una vez observado si hay o no efecto citopático, es utilizado para detectar el virus por PCR. No obstante, esta técnica solamente es válida en el caso de virus para los que existen líneas celulares susceptibles; sin embargo, existen muchos patógenos tanto en humana como en veterinaria para los que no se dispone de sistemas de cultivo celular (Rodríguez *et al.*, 2009), tal y como ocurre con el AMDV, donde no se ha conseguido un método válido para el cultivo de las cepas de campo (Knuuttila, 2015). Con todo, hay que tener en cuenta que dada la extremada resistencia del AMDV, y de los parvovirus en general, a condiciones adversas (Hahn *et al.*, 1977; Eterpi *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2014) es muy probable que exista una elevada correlación entre los EG detectados mediante PCR y la cantidad de virus infectivo presente en la muestra, particularmente cuando los elementos muestreados no han estado sometidos previamente a un tratamiento de desinfección.





## **CAPÍTULO 2**

# **OBJETIVOS**





La erradicación de la AD ha sido, y es hoy día, una prioridad en las granjas de visones en todo el mundo. Sin embargo, pese a la inmensa cantidad de recursos empleados y los esfuerzos realizados por ganaderos y veterinarios, la erradicación de la enfermedad no ha sido alcanzada tras más de 45 años de campañas de erradicación. De hecho, los rebrotes de la enfermedad en granjas que la habían previamente erradicado, así como nuevas infecciones en granjas que nunca la habían padecido, son relativamente frecuentes. Estos fracasos conducen a algunas granjas, incluso a países enteros, a trabajar con infección endémica y seleccionar por resistencia/tolerancia a la enfermedad. Se acepta que uno de los factores implicados está asociado al reservorio ambiental del virus en las granjas que padecieron previamente la enfermedad. Las dificultades para estudiar este reservorio y definir mejor las vías de contagio y entrada del virus en las explotaciones pueden ser superadas, al menos en parte, mediante el empleo de las modernas técnicas moleculares: detección ambiental y filogenia. La presente tesis tiene por objeto la aplicación de estas nuevas herramientas de al estudio epidemiológico de la enfermedad. Los objetivos marcados son:

1. Estudiar la viabilidad de la detección del AMDV en muestras ambientales mediante qPCR en granjas con diferentes calificaciones sanitarias y valorar su posible aplicación al estudio epidemiológico y a la prevención, control y erradicación de esta enfermedad.
2. Comparar dos métodos de extracción de ADN en muestras ambientales y proponer un esquema de análisis para maximizar la detección del AMDV en este tipo de muestras.
3. Estudiar la distribución del virus en el ambiente de las granjas infectadas y evaluar en base a dichas evidencias las implicaciones del reservorio ambiental en la epidemiología de la enfermedad.
4. Aplicar la detección ambiental en la evaluación de medidas de bioseguridad a seguir en las visitas a explotaciones.
5. Realizar la tipificación molecular y estudiar las relaciones filogenéticas de las cepas circulantes en las granjas en el suroeste de Europa en el periodo 2012-2020.
6. En base a estos conocimientos realizar propuestas para mejorar los actuales programas de control y erradicación de la enfermedad.



**CAPÍTULO 3**

**MATERIAL Y MÉTODOS**





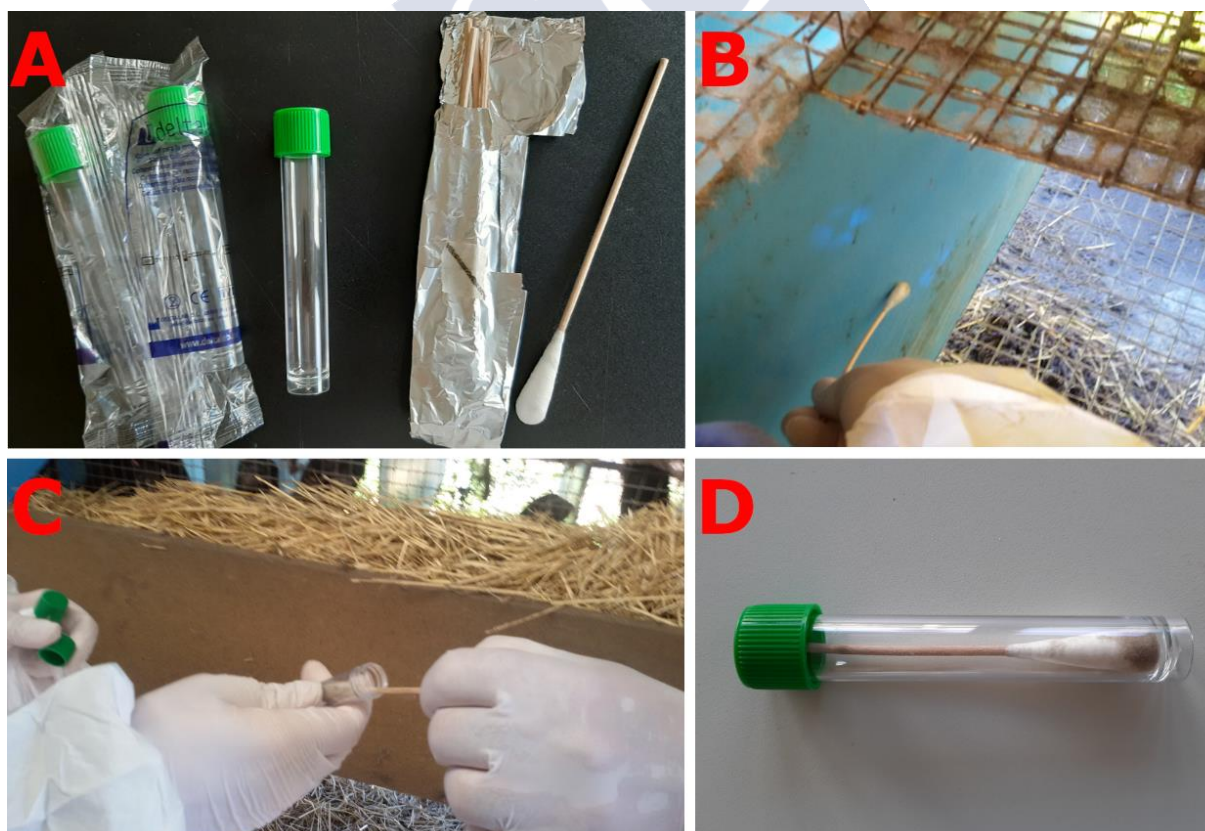


### 3.1. TOMA DE MUESTRAS

#### 3.1.1. Muestras ambientales

Las muestras ambientales recogidas en los cuatro estudios de esta tesis incluyeron diferentes superficies y elementos presentes en las explotaciones. El muestreo se realizó durante visitas a las granjas específicamente destinadas a este fin y tuvieron una duración de 30-60 minutos. Las muestras relacionadas con los visitantes (zapatos, ropa, calzas y buzos desechables) fueron tomadas fuera de la explotación, al inicio y/o al final del muestreo en función del estudio concreto. Para la recogida de estas muestras ambientales se utilizaron hisopos estériles de algodón de 11 mm de diámetro; una vez tomada la muestra, cada hisopo se introdujo en un tubo estéril de polipropileno de 12 ml con tapón de rosca (Deltalab, Barcelona, España) (Figura 16). Las muestras fueron mantenidas en refrigeración (2-8 °C) hasta su llegada al laboratorio, y una vez allí se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su procesado y análisis.

Cada muestra fue recogida recorriendo con el hisopo la superficie a muestrear durante 20-30 segundos, y rotando el hisopo a lo largo del recorrido. En la tabla 13 se especifica cuáles fueron los tipos de muestras recogidas, así como las características particulares de la toma de muestras en cada caso.



**Figura 16.** Material empleado y proceso de recogida de muestras ambientales: A) Tubos estériles de polipropileno de 12 ml e hisopos estériles de algodón de 11 mm de diámetro; B) Toma de muestra ambiental sobre la pared de una jaula; C) Introducción del hisopo en el tubo estéril; D) Muestra ambiental a su llegada al laboratorio.

**Tabla 13. Tipos de muestras recogidas y método de recogida para cada uno de ellos.**

Tipo de muestra	Observaciones
<b>Jaulas</b>	Cuatro pases sobre la cara interna de cada una de las dos paredes laterales y suelo de la jaula.
<b>Heces</b>	Introduciendo el hisopo en al menos 5 puntos diferentes a lo largo de la línea de deyecciones situadas bajo las jaulas, a lo largo de un tramo de aproximadamente 10 metros (5 cerchas).
<b>Guantes de sujeción de animales</b>	Superficies palmar y dorsal de ambos guantes y espacios interdigitales.
<b>Carro de sacrificio de animales</b>	Cuatro pases sobre tres paredes interiores del carro (paredes laterales y suelo) y la trampilla de entrada de los animales.
<b>Suelos de la granja</b>	Dos pases a lo largo de una sección de pasillo de unos dos metros de longitud (una cercha); en total dos tramos de pasillo distantes entre sí más de 20 metros (10 cerchas)
<b>Efluentes</b>	Canales de salida de aguas residuales provenientes de la zona de jaulas, pasando el hisopo por las paredes.
<b>Almacenes</b>	Superficie superior de material y equipamiento almacenado (madera, herramientas, malla metálica, carros...).
<b>Zonas de descanso y reunión del personal (comedores, oficinas, etc.)</b>	Suelo. Superficie superior de sillas y mesas. Puertas e interior de armarios y taquillas.
<b>Calzado* (de calle, de trabajo, calzas desechables)</b>	Superficie superior e inferior.
<b>Ropa* (de calle, de trabajo, monos desechables)</b>	Superficie del cuerpo, brazos y piernas.
<b>Silo de alimento</b>	Pasamanos y superficie de los peldaños; tapa de apertura del silo y su asa. Siempre en sentido ascendente.
<b>Vehículos</b>	Superficie de asientos, salpicadero, volante, pedales y suelo.
<b>Rodadas de vehículos</b>	Huella de la rodada de los camiones que descargan el pienso. Dos pases por la huella con una longitud de pase de dos metros.
<b>Rodaluvio</b>	Introduciendo el hisopo en líquido del rodaluvio.

\* Se definió ropa o calzado de calle como aquel con el que los trabajadores llegan a la granja y que cambian por el de trabajo. Al terminar la jornada, los trabajadores cambian de nuevo la ropa y calzado de trabajo por el de calle para salir de la explotación.

### 3.1.2. Muestras biológicas

Para la realización de uno de los estudios de esta tesis (estudio 4) se emplearon muestras de bazo de animales que habían obtenido un resultado positivo a la prueba serológica CIEP dentro del programa de control de la enfermedad realizado por las explotaciones. Dichos animales fueron sacrificados en granja dentro de dicho programa de control, recogiendo los bazos durante la necropsia en un frasco estéril y enviándolos a continuación al laboratorio para la confirmación de la infección mediante qPCR. Las muestras de bazo fueron mantenidas en refrigeración (2-8 °C) hasta su envío al laboratorio en contenedor refrigerado y por mensajería urgente (12-16 horas); una vez en el laboratorio se mantuvieron a -20 °C hasta su posterior procesado y análisis.

### 3.2. PROCESADO DE MUESTRAS

#### 3.2.1. Preparación de muestras ambientales

Una vez en el laboratorio, las muestras ambientales se procesaron mediante el siguiente protocolo:

1. Añadir 5 ml de PBT al tubo que contiene el hisopo (PBT = PBS con 0,05% de Tween20; todos los reactivos suministrados por Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos).
2. Vortear durante 1 minuto.
3. Reposar en posición vertical durante 15 minutos.
4. Transferir 1 ml de la elución del hisopo a un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml.

A continuación, las eluciones así obtenidas se emplearon como material de partida para la extracción y purificación del ADN.

#### 3.2.2. Extracción y purificación del ADN

En los diferentes estudios de esta Tesis Doctoral se emplearon dos protocolos diferentes para la extracción y purificación del ADN basados en dos kits comerciales: el protocolo A (NucleoSpin® Soil, Macherey-Nagel, Düren, Alemania), que emplea un kit específico diseñado para una mayor eliminación de inhibidores presentes en muestras ambientales con elevada cantidad de materia orgánica en descomposición, y el protocolo B (High Pure PCR Template Kit, Roche, Mannheim, Alemania), basado en un kit general de extracción de ADN diseñado para su empleo sobre cualquier tipo de muestra biológica. En el caso de muestras de origen ambiental, en el estudio 1 solamente se utilizó el protocolo A, mientras que en los restantes estudios (2-4) se utilizaron ambos protocolos en paralelo para cada muestra. En el caso de las muestras biológicas empleadas en el estudio 4, éstas fueron procesadas únicamente empleando el protocolo B. Todos los reactivos utilizados en ambos protocolos fueron suministrados por el fabricante de cada uno de los kits comerciales, con excepción del control interno positivo (CIP) que fue suministrado por el fabricante del kit de qPCR utilizado para el posterior análisis de las muestras (apartado 3.3.1).

##### 3.2.2.1. Protocolo A (NucleoSpin® Soil)

1. Transferir 200 µl de la elución del hisopo al NucleoSpin® Bead Tube, que contiene perlas de cerámica que facilitan la lisis mecánica del material biológico. Añadir 700 µl del tampón SL1 (tampón de lisis química) y 4 µl de CIP.
2. Agitar los NucleoSpin® Bead Tubes de forma vertical en un vorteador durante 5 minutos a temperatura ambiente para realizar la lisis de las muestras. Centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm (revoluciones por minuto).
3. Añadir 150 µl de tampón SL3 (quelante de ácidos húmicos y proteínas, los cuales pueden actuar como inhibidores de la PCR). Vortear 5 segundos e incubar las muestras durante 5 minutos a 0-4 °C. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm para que quede un sobrenadante limpio.

4. Colocar un NucleoSpin® Inhibitor Removal Column (columna de filtración) dentro de un tubo eppendorf de 2 ml. Introducir en la columna 650 µl del sobrenadante obtenido en el paso anterior y centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm.
5. Añadir 250 µl de tampón SB, que facilita la unión del ADN, a la columna de sílica empleada en el paso 6 y vortear durante 5 segundos.
6. Colocar un NucleoSpin® Soil Column (columna de sílica) en un tubo colector. Introducir 550 µl de muestra en la columna. Centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm. Eliminar el líquido del tubo colector. Cargar el resto de muestra en el tubo colector y centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm. Volver a eliminar el líquido del tubo colector.
7. Primer lavado: añadir 500 µl de tampón SB, que facilita la unión del ADN a la membrana, en el NucleoSpin® Soil Column. Centrifugar durante 30 segundos a 13.000 rpm. Eliminar el líquido del tubo colector y volver a colocar la columna.
8. Segundo lavado: añadir 550 µl de tampón de lavado SW1 en el NucleoSpin® Soil Column y centrifugar a 13.000 rpm durante 30 segundos. Eliminar el líquido del tubo colector.
9. Tercer lavado: añadir 700 µl de tampón de lavado SW2 en el NucleoSpin® Soil Column. Vortear durante 2 segundos. Después centrifugar durante 30 segundos a 13.000 rpm. Eliminar el líquido del tubo colector.
10. Cuarto lavado: repetir exactamente el paso 9.
11. Centrifugar las columnas durante 3 minutos a 13.000 rpm para favorecer el secado de la membrana de sílica.
12. Colocar la columna en un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml. Añadir 100 µl de tampón SE precalentado a 80 °C e incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar 30 segundos a 13.000 rpm. De esta manera se consigue la elución del ADN que se encuentra en la sílica hacia el tubo eppendorf, donde se recoge dicho ADN para su posterior análisis mediante qPCR.

#### 3.2.2.2. Protocolo B (High Pure PCR Template Kit)

1. Añadir en un eppendorf estéril de 1,5 ml con rosca:
  - 200 µl de elución del hisopo (muestras ambientales) o bien 50 mg de tejido (muestras de bazo).
  - 200 µl de Tissue Lysis Buffer (tampón de lisis).
  - 40 µl de Proteinasa K reconstituida.
  - 4 µl de CIP.
2. Vortear 1 minuto e incubar 1 hora a 55 °C.
3. Añadir 200 µl de Binding Buffer, que favorece las condiciones para la unión del ADN a la membrana.
4. Vortear 1 minuto e incubar 10 minutos a 70 °C.
5. Añadir 100 µl de isopropanol y vortear 15 segundos.
6. Colocar una columna de sílica en un tubo colector y pipetear toda la muestra en la columna. Centrifugar 1 minuto a 9.300 rpm. Colocar la columna sobre un nuevo tubo colector y desechar el anterior.

7. Añadir 500 µl de Inhibitor Removal Buffer. Centrifugar 1 minuto a 9.300 rpm. Colocar la columna sobre un nuevo tubo colector y desechar el anterior.
8. Primer lavado: añadir 500 µl de Wash Buffer. Centrifugar 1 minuto a 9.300 rpm. Colocar la columna sobre un nuevo tubo colector y desechar el anterior.
9. Segundo lavado: repetir exactamente el paso 8.
10. Centrifugar 3 minutos a 10.400 rpm para el secado de membrana.
11. Colocar la columna en un nuevo tubo eppendorf estéril de 1,5 ml. Añadir en la columna 100 µl de Elution Buffer a 70 °C. Dejar incubar 1 minuto y centrifugar 1 minuto a 9.300 rpm. Desechar la columna y almacenar la elución de ADN para su posterior análisis mediante qPCR.

### 3.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS

#### 3.3.1. Técnica de qPCR

La técnica de qPCR se utilizó en los cuatro estudios de esta Tesis Doctoral. Para la realización de esta técnica se empleó un kit comercial de qPCR (Genesig® AIDV Advanced Kit, PrimerDesign™ Ltd., Southampton, Reino Unido), que suministra todos los reactivos y enzimas necesarios para realizar la detección y cuantificación del AMDV presente en una muestra, amplificando una región específica del gen de la proteína no estructural NS1. Resumidamente, para la detección del patógeno se emplean cebadores y una sonda Taqman® marcada con el fluorocromo FAM específicos para el gen NS1 del AMDV; además, el kit proporciona también un CIP (control interno positivo) exógeno que debe añadirse a la muestra durante el proceso de extracción, así como cebadores y sonda Taqman® marcada con el fluorocromo VIC diseñados para detectar dicho CIP, lo que permite revelar la existencia de posibles problemas de inhibición de la qPCR que pudieran producirse. Para la realización de esta técnica se empleó un termociclador de tiempo real Applied Biosystems ABI Prism 7500 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

##### 3.3.1.1. Protocolo de la técnica

1. Diseñar la plantilla de trabajo indicando en qué pocillo de la placa irá cada muestra y cada control (positivo/negativo). El control positivo y sus diluciones seriadas se analizaron por duplicado.
2. Preparar para cada muestra de ADN una *mastermix* de acuerdo con la tabla 14.

Tabla 14. Componentes de la *mastermix* utilizados en la reacción qPCR para cada muestra individual.

Componente	Volumen/muestra
Oasig™ 2x qPCR <i>Mastermix</i>	10 µl
Cebador + sonda para detección del AMDV	1 µl
Cebador + sonda para detección del CIP	1 µl
Agua libre de ARNasas yADNasas	3 µl
Volumen final	15 µl

CIP: Control interno positivo



3. Preparar las diluciones decimales seriadas del Control Positivo Externo (CPE) suministrado con el kit que se emplearán para calcular la curva estándar:
  - a. Pipetear 90  $\mu\text{l}$  del tampón de preparación dentro de cuatro tubos eppendorf y designarlos del número 2 al 6.
  - b. Pipetear 10  $\mu\text{l}$  del CPE dentro del tubo 2.
  - c. Vortear y centrifugar brevemente.
  - d. Pipetear 10  $\mu\text{l}$  desde el tubo 2 al tubo 3.
  - e. Vortear y centrifugar brevemente.
  - f. Repetir los pasos “d” y “e” para completar la serie de diluciones hasta el tubo n° 6 tal como muestra tabla 15.

**Tabla 15. Número de copias de ADN por cada dilución del Control Positivo Externo (CPE).**

Diluciones para el cálculo de la curva estándar	Número de copias/ $\mu\text{l}$
Tubo 1 = CPE	$2 \times 10^5$
Tubo 2	$2 \times 10^4$
Tubo 3	$2 \times 10^3$
Tubo 4	$2 \times 10^2$
Tubo 5	$2 \times 10^1$
Tubo 6	2

4. Pipetear 15  $\mu\text{l}$  de *mastermix* dentro de cada pocillo individual de una placa de qPCR.
5. Añadir muestras y controles:
  - a. Pipetear 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra a su pocillo correspondiente de acuerdo con la plantilla de trabajo.
  - b. Pipetear 5  $\mu\text{l}$  del CPE y de cada una de las diluciones seriadas (tubos n° 2 al 6) de acuerdo con la plantilla de trabajo.
  - c. Pipetear 5  $\mu\text{l}$  de agua libre de ARNasas y ADNasas (control negativo) a su pocillo correspondiente de acuerdo con la plantilla de trabajo.
6. Sellar la placa con film óptico y centrifugar durante 1 min a 1.600 rpm. Introducir la placa en el termociclador.
7. Programar el termociclador con el protocolo de amplificación descrito en la tabla 16.

**Tabla 16. Protocolo térmico para la amplificación del ADN en la reacción qPCR.**

Paso	Tiempo	Temperatura
Activación enzimática	2 min	95 °C
Ciclo (x 50)	Desnaturalización	10 s 95 °C
	Alineamiento + Elongación	60 s 60 °C

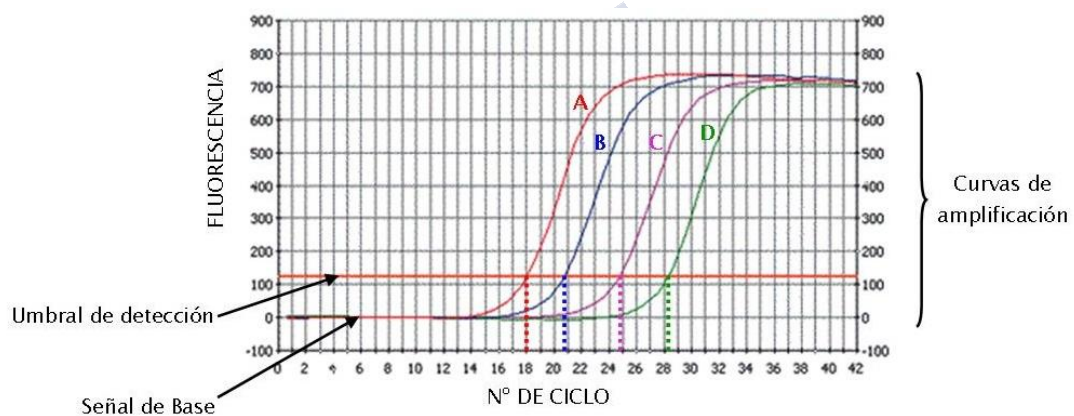
### 3.3.1.2. Interpretación de resultados

Para cada muestra se obtiene una curva de amplificación que representa el incremento de fluorescencia que se va registrando en cada pocillo para cada ciclo de amplificación. La típica



curva de amplificación posee una zona de señal de base (*background*), que se corresponde a los 10 ó 15 primeros ciclos en los cuales no se aprecia ningún tipo de amplificación. A continuación, aparece una zona de crecimiento exponencial de la fluorescencia, y finalmente una zona estacionaria (Figura 17).

Para cada análisis, el termociclador estima un nivel de fluorescencia que se denomina umbral de detección o *threshold*, de tal manera que las señales de fluorescencia que cruzan dicho umbral se consideran significativas con respecto a la señal de base. De la intersección entre la curva de amplificación y el umbral de detección se obtiene un valor denominado ciclo umbral o *cycle threshold* (Ct), que representa el n° de ciclo en el que la señal de fluorescencia se considera significativa y, por tanto, que existe una lectura positiva para ese canal de fluorescencia para dicha muestra. Hay que señalar que el valor de Ct detectado para una muestra es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en dicha muestra.



**Figura 17.** Esquema de los componentes e interpretación de los ciclos umbrales de la PCR a tiempo real. Se representan con diferentes letras (A, B, C, D) las curvas obtenidas para muestras con diferente concentración del ADN diana.

Para cada muestra problema analizada se obtienen datos relativos a la fluorescencia (amplificación) proveniente de cada uno de los dos fluorocromos empleados, FAM (detección del patógeno) y VIC (detección del CIP), cada uno de los cuales se obtiene por canales diferentes:

- Canal FAM: un resultado positivo en la amplificación implica la obtención de una curva de fluorescencia típica con un valor del Ct < 50.
- Canal VIC: un resultado positivo en la amplificación implica la obtención de una curva de fluorescencia típica con un valor Ct < 50. Este canal debe mostrar amplificación para cada una de las muestras problema, y sus valores de Ct deben oscilar entre 25-40.

Todas las combinaciones posibles de resultados que pueden darse (tabla 17), así como su interpretación, se describen a continuación:

- Caso A: resultado positivo. Se ha detectado ADN de AMDV mediante la sonda FAM.
- Caso B: resultado positivo. Este resultado puede darse cuando una muestra positiva contiene una cantidad muy elevada de ADN específico del patógeno, el cual compite por

los recursos de la *mastermix* con el ADN del CIP que, al estar en una cantidad más reducida, ve inhibida su amplificación.

- Caso C: resultado negativo. No se ha detectado la presencia del ADN de AMDV mediante la sonda FAM, pero sin embargo sí existe amplificación del CIP (sonda VIC), lo que indica que no ha habido inhibición de la reacción de qPCR.
- Caso D: resultado inválido. En este caso el resultado no se puede valorar, ya que no se ha detectado el CIP mediante la sonda VIC. Se debe repetir el ensayo.

**Tabla 17. Combinación de los posibles resultados obtenidos en la qPCR.**

CASO	CANAL FAM	CANAL VIC	RESULTADO
A	+	+	Positivo
B	+	-	Positivo
C	-	+	Negativo
D	-	-	Nulo

### 3.3.1.3. Cuantificación

Para cada placa de muestras analizada, los valores de Ct obtenidos para cada dilución del CPE son utilizados por el software del termociclador para construir una recta del tipo  $y = ax + b$ , donde “y” representa el Ct obtenido y “x” representa el logaritmo decimal de la concentración de ADN, siendo “a” la pendiente de la recta y “b” la ordenada en origen. Además, dicho software calcula también el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), que debe ser igual o superior a 0,999, y también el porcentaje de eficiencia de la reacción ( $Ef = 10^{-1/a}$ ), cuyo valor debe oscilar entre 90-110%.

A continuación, con el valor de Ct obtenido para cada muestra problema positiva se sustituye la “y” de la ecuación de la recta por cada Ct, obteniendo el logaritmo decimal de la concentración de ADN inicial ( $\log [\text{ADN}]$ ) que había en dicha muestra. Así, mediante el cálculo del antilogaritmo de dicho valor se obtuvo la concentración inicial de ADN presente en cada reacción positiva, expresado como nº de copias de la diana NS1/reacción, o equivalentes genómicos/reacción. A continuación, para cada uno de estos valores de concentración por reacción se calculó el nº de copias de NS1/hisopo (equivalentes genómicos/hisopo=EG/hisopo) en el caso de muestras ambientales y el nº de copias de NS1/50 mg de tejido en el caso de muestras de bazo (equivalentes genómicos/50 mg de tejido), multiplicando los valores iniciales por 500 y por 20 respectivamente.

### 3.3.2. Amplificación y secuenciación parcial de las dianas moleculares NS1 y VP2

Para la realización del estudio 4 se emplearon dos protocolos similares de PCR convencional para la amplificación parcial de los genes NS1 y VP2 del AMDV. Una vez obtenido el producto amplificado, éste se visualizó primeramente en un gel de agarosa para comprobar que el tamaño del amplicón coincidía con el del producto esperado y se procedió a su posterior secuenciación.

### 3.3.2.1. Protocolo de las técnicas de PCR convencional para la amplificación parcial de las dianas NS1 y VP2.

Para la realización de estos protocolos se emplearon dos pares de primers previamente descritos:

- NS1: fragmento de 390 pb (Olofsson *et al.*, 1999).
  - AMDV2: 5'-AAACTCAGCAATTTTCATATTCAC-3'
  - AMDV3: 5'-TCGTTCTTTGTTAGTTAGGTTGTC-3'
- VP2: fragmento de 665 pb (Oie *et al.*, 1996).
  - VP2for: 5'-CTTGTCACGCTACTAGAATGGT-3'
  - VP2rev: 5'-AGCTTAAGGTTAGTTTACATGGTTTACT-3'

Para ambos protocolos de PCR cada reacción se preparó en un volumen final de 25 µl que contenía una concentración final de 2,5 U de NZYTaq II DNA Polymerase, 1x Reaction Buffer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato NZYMix (todos estos reactivos suministrados por NZYTech Lda., Lisboa, Portugal), 0,5 µM de cada primer y 5 µl de la elución del ADN de la muestra a analizar. Las reacciones se analizaron en un termociclador Bio-Rad T100 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, Estados Unidos), empleando para ambas dianas moleculares el protocolo térmico descrito por Leimann *et al.*, (2015) (Tabla 18).

**Tabla 18. Protocolo térmico empleado para la amplificación parcial de los genes NS1 y VP2 (Leimann *et al.*, 2015).**

Paso		Temperatura	Tiempo
Activación de la Taq-polimerasa ( <i>Hot-Start</i> )		95°C	60 s
10 ciclos <i>touch-down</i> (disminuyendo la temperatura de alineamiento 0,5°C en cada ciclo)	Desnaturalización	95°C	20 s
	Alineamiento	55°C	30 s
	Elongación	68°C	60 s
28 ciclos estándar	Desnaturalización	95°C	20 s
	Alineamiento	50°C	30 s
	Elongación	68°C	60 s
Extensión final		68°C	5 min

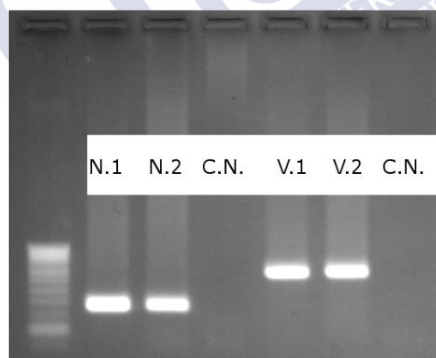
### 3.3.2.2. Visualización de los productos amplificados

Una vez obtenidos los productos de PCR para cada diana, se procedió a realizar un protocolo de electroforesis en gel de agarosa al 1% para a continuación visualizar los productos amplificados en un analizador de imagen. El protocolo empleado fue el siguiente:

1. Añadir 0,6 g de agarosa en 60 ml de tampón TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA) (todos los reactivos suministrados por NZYTech Lda., Lisboa, Portugal). Disolver llevando a ebullición.
2. Dejar enfriar hasta aproximadamente 50° C y añadir 4 µl de RedSafe™ (iNtRON Biotechnology Inc., Boston, MA, Estados Unidos). Agitar y dispensar en el molde del

- gel, previamente equilibrado y con el peine colocado para la formación de los pocillos. Dejar solidificar el gel durante 40 min.
3. Colocar el soporte del gel en la cubeta de electroforesis, añadiendo a continuación tampón TAE 1x hasta la marca superior de la cubeta.
  4. Cargar en el primer pocillo del gel 5  $\mu$ l de NZYDNA Ladder V (escala de ADN) (NZYTech Lda., Lisboa, Portugal).
  5. En una placa de dilución, añadir en cada pocillo 2  $\mu$ l de 6x NZYDNA loading dye (tampón de carga) (NZYTech Lda., Lisboa, Portugal) y 10  $\mu$ l de producto de PCR, homogeneizando mediante pipeteo. Cargar el volumen total de cada pocillo de la placa en su correspondiente pocillo del gel.
  6. Cerrar la cubeta y programar la fuente de alimentación a 400 mA y 100 V durante 40 min.
  7. Extraer el soporte del gel escurriendo lo máximo posible el líquido superior y colocarlo en el analizador de imagen (Bio-Rad Fluor-S MultiImager, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, Estados Unidos), obteniendo una captura digital.

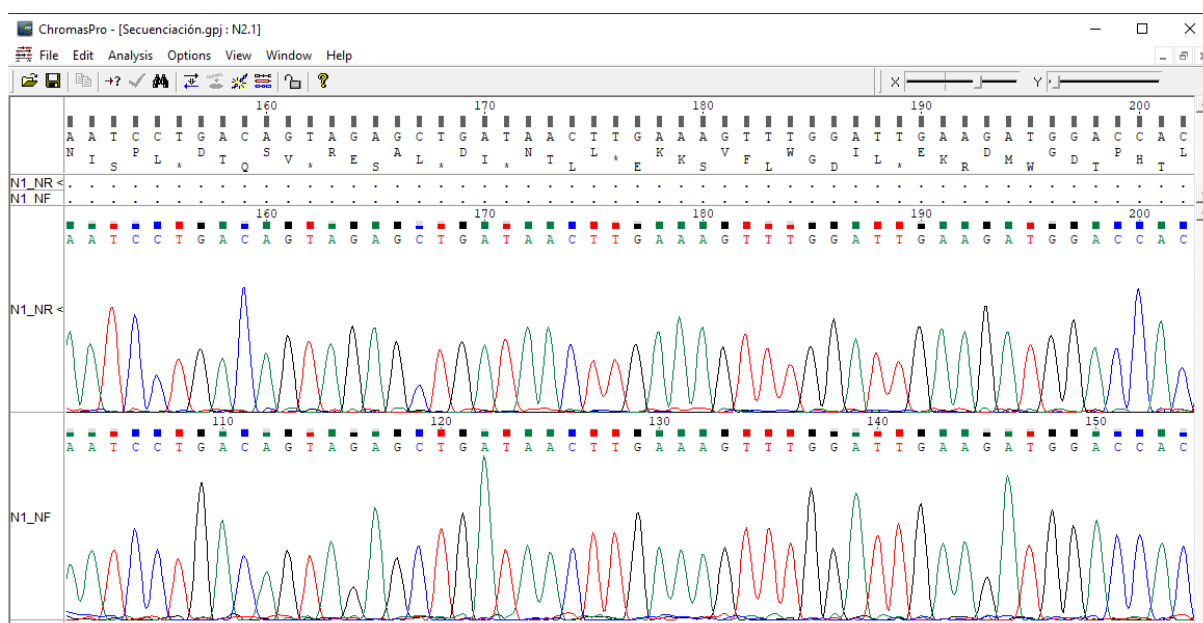
Una vez obtenida la captura digital, se comprobó para cada muestra la existencia de una banda del tamaño deseado comparándola con la escala de ADN del primer pocillo del gel (figura 18). Al mismo tiempo, se verificó que la intensidad de cada banda fuese al menos igual a la banda de 200 pb de la escala de ADN, que se corresponde con una concentración de 60 ng de ADN/banda. Las muestras amplificadas que presentaron al menos esta concentración fueron congeladas hasta su posterior secuenciación.



**Figura 18.** Foto de un gel de agarosa tras electroforesis de productos de PCR. De izquierda a derecha: ladder, muestras positivas para el fragmento NS1 (N.1 y N.2), control negativo para NS1 (C.N.), muestras positivas para el fragmento VP2 (V.1 y V.2), control negativo para VP2 (C.N.).

### 3.3.2.3. Secuenciación y procesamiento de secuencias

Los productos de PCR que presentaron las características mencionadas en el apartado anterior fueron enviadas a la Unidad de Secuenciación y Análisis de fragmentos de la Universidad de Santiago de Compostela, donde fueron purificadas y secuenciadas mediante el método dideoxy en un secuenciador ABI-Prism 3730xl DNA de Applied Biosystems (Foster City, CA, Estados Unidos). A continuación, el servicio de secuenciación devolvió los cromatogramas obtenidos para las hebras sentido y antisentido de cada una de las muestras analizadas. Para cada muestra, los cromatogramas de ambas hebras se ensamblaron y se corrigieron manualmente utilizando el programa informático ChromasPro 2.1.4 (Technelysium, Brisbane, Australia) (Figura 19), almacenando las secuencias consenso en formato FASTA hasta su posterior análisis.



**Figura 19.** Imagen del software informático ChromasPro 2.1.4 con el que se realizó la corrección manual y el ensamblado de los cromatogramas obtenidos para cada muestra. Pueden verse los dos cromatogramas (N1\_NR arriba y N1\_NF abajo) obtenidos para el fragmento NS1 de una de las muestras de esta tesis.

### 3.4. ESTUDIO 1: APLICACIÓN DEL QPCR PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN EN MUESTRAS AMBIENTALES DE GRANJA

Este estudio descriptivo se realizó en diez explotaciones de producción de visón situadas en la Comunidad Autónoma de Galicia, que se clasificaron en cuatro categorías según su estado sanitario en relación con la AD (Tabla 19). La toma de muestras ambientales (n=79, tabla 20) se realizó entre julio y octubre de 2013, recogiendo diferentes tipos de muestras en cada granja según la categoría sanitaria asignada:

- Cinco explotaciones tipo A (libres de infección). Estas granjas, que fueron utilizadas como control, habían presentado resultados negativos en los controles serológicos durante al menos los últimos 10 años. Además, todas compartían una serie de características importantes respecto a la bioseguridad: presentan cierre perimetral, no se permite la entrada de vehículos y visitantes sin medidas de bioseguridad<sup>8</sup> y la descarga de alimento en los silos se realiza desde el exterior de la granja sin que los vehículos accedan al interior. En estas granjas se tomaron únicamente muestras del silo de alimento y de la rodada de los camiones, dado que se consideró que el mayor riesgo de entrada del virus en la explotación era el camión del pienso.
- Una explotación tipo B (riesgo de reinfección). Se trataba de una granja positiva hasta el año 2012 (prevalencia al CIEP = 93%), que al final de ese año inició un proceso de “*stamping-out*”: sacrificio de todos los animales en noviembre-diciembre y vacío sanitario seguido de exhaustiva limpieza y desinfección. Al final del proceso, hacia el 10 de abril de 2013, repobló con una cabaña negativa (hembras gestantes) adquirida en una granja certificada.
- Una explotación tipo C (riesgo de nueva infección). Aunque esta granja cumplía la condición de no tener resultados positivos en los controles serológicos en los últimos 10 años, compartía desde hacía un año un trabajador con una explotación con infección confirmada.
- Tres explotaciones tipo D (infección confirmada). Estas tres granjas, previamente negativas, se infectaron entre mayo de 2012 y enero de 2013, presentando en el momento del muestreo una prevalencia superior al 30%.

---

<sup>8</sup> Sólo se permite la entrada de vehículos imprescindibles para la operativa de la granja y siempre previa desinfección de las ruedas. Todos los visitantes tienen que vestir buzos y calzas previo al acceso al recinto donde se alojan los animales, se lavan las manos antes de entrar y está prohibido el uso de móviles, cámaras y otros dispositivos electrónicos.



Tabla 19. Clasificación y antecedentes previos de las granjas incluidas en el estudio 1.

Tipo de granja (n°)	% animales seropositivos en últimos muestreos <sup>a</sup>	Resultados test anual <sup>a</sup>	Observaciones
<b>A (5): Libres de infección</b>	0% Enero 2013	Negativa en los últimos 10 años	
<b>B (1): En riesgo de reinfección</b>	0% Junio y Octubre 2013	Positiva durante 2003 - 2012	Sacrificio de todos los animales en nov. 2012 y repoblación con animales de una granja libre de AMDV en abril de 2013
<b>C (1): En riesgo de nueva infección</b>	0 % Enero y Junio 2013	Negativa en los últimos 10 años	Un trabajador compartido desde 2012 con una granja con infección confirmada
<b>D (3): Con infección confirmada</b>	Oct 2012/Oct 2013: D1: No testó/33% <sup>b</sup> D2: 4%/37% <sup>c</sup> D3: 25%/No testó	Alta prevalencia en los 6-12 meses previos al muestreo	Granjas en fase de expansión epizootica

<sup>a</sup> Prueba de contra-inmunolectroforesis (CIEP). En enero se testaron todos los animales (cabaña reproductora); en junio, sólo hembras reproductoras (total o parcial); en octubre, test parcial sobre una muestra (reproductores y crías).

<sup>b</sup> Se infectó en enero 2013 (1 positivo en enero, 2,8% en junio y 33% en octubre de 2013)

<sup>c</sup> Test ELISA.

Tabla 20. Tipo y número de muestras ambientales recogidas en cada una de las granjas incluidas en el estudio 1.

Tipo de muestra	Tipo y n° de granja									
	A1	A2	A3	A4	A5	B1	C1	D1	D2	D3
Silo de alimento	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Suelo: huellas de rodada de camión	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Jaulas						1		3	2	4
Heces								2	2	5
Efluentes						2	2	1	2	2
Rodaluvio									1	
Zona de descanso y reunión del personal							1		3	1
Calzado de calle						1	1		1	1
Ropa de calle						1	1		1	1
Almacenes						1	2		1	3
Guantes de sujeción									1	1
Vehículos						2	1		1	2
Buzos desechables										1
Calzado de trabajo										1
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>17</b>	<b>24</b>

Cada tipo de muestra ambiental se recogió tal y como se ha descrito en el apartado 3.1.1. Para este estudio, la extracción y purificación de ADN de las muestras ambientales se realizó únicamente con el protocolo A (apartado 3.2.2.1) y a continuación se analizaron y cuantificaron mediante el protocolo de qPCR descrito (apartado 3.3.1). Para cada tipo de muestra se determinó el número de muestras positivas, así como la media de equivalentes genómicos por hisopo.



### 3.5. ESTUDIO 2: DISTRIBUCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN EN EL AMBIENTE DE GRANJAS INFECTADAS

En este estudio se incluyeron siete explotaciones de producción de visón con infección por AMDV confirmada, seis de ellas en Galicia y una del suroeste de Francia. Todas estas granjas compartían la característica de ser granjas con historial negativo que se infectaron entre los años 2012 y 2014, mostrando valores de seroprevalencia entre 16,6% y 68,9% previamente a la toma de muestras ambiental.

Las muestras recogidas en cada granja se clasificaron en nueve categorías en función del tipo de muestra y la proximidad a los animales (Tabla 21). La toma de muestras se realizó entre los años 2013-2016 utilizando los protocolos de recogida descritos en el apartado 3.1.1.

**Tabla 21. Tipo y número de muestras incluidas en cada categoría.**

Categoría nº	Nombre de la categoría	n	Descripción
1	Jaulas	14	Jaulas de alojamiento de los animales en las naves
2	Suelo/Estiércol	9	Suelo de las naves y estiércol bajo las jaulas
3	Guantes de sujeción	11	Guantes para la inmovilización de animales
4	Carro de sacrificio	8	Interior del carro de sacrificio de animales
5	Dependencias	18	Almacenes, vestuario, comedor
6	Visitas	11	Equipos de Protección Individual (EPI): buzos y calzas después de la visita
7	Calle	12	Ropa y calzado de calle de trabajadores; vehículos
8	Efluentes	16	Efluentes (canalizaciones de salida de agua/lixiviados)
9	Periferia	15	Silos, plataforma de maniobra del camión del pienso, cara interna del muro perimetral.

Una vez en el laboratorio las muestras se prepararon y procesaron utilizando ambos protocolos de extracción tal y como se describe en el apartado 3.2. A continuación, el ADN obtenido se analizó mediante la técnica de qPCR anteriormente descrita (apartado 3.3.1).

Para la comparación de los dos métodos de extracción de ADN, con los resultados obtenidos mediante qPCR se calculó para cada categoría de muestras el número y porcentaje de muestras positivas al AMDV, así como la media de EG/hisopo, rango y error estándar de la media. Para la realización de los análisis estadísticos, el número de equivalentes genómicos del AMDV de las muestras positivas se transformó a logaritmo decimal debido a la no normalidad de los datos, verificando tras la transformación el cumplimiento de dicho criterio. A continuación, se empleó el análisis estadístico ANOVA robusto de Welch y la prueba post-hoc T3 de Dunnett para determinar la existencia de diferencias significativas entre las diferentes categorías para cada método de extracción de ADN. Además, se evaluó la concordancia existente entre ambos protocolos de extracción para la clasificación como positivo/negativo de todas las muestras, empleando para ello las pruebas estadísticas kappa de

Cohen y test de McNemar. Por último, se estudiaron las diferencias existentes entre la media de copias del AMDV obtenida por cada método de extracción mediante el empleo de la prueba t de Student para grupos dependientes en aquellas muestras positivas a ambos protocolos.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics v.20 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).



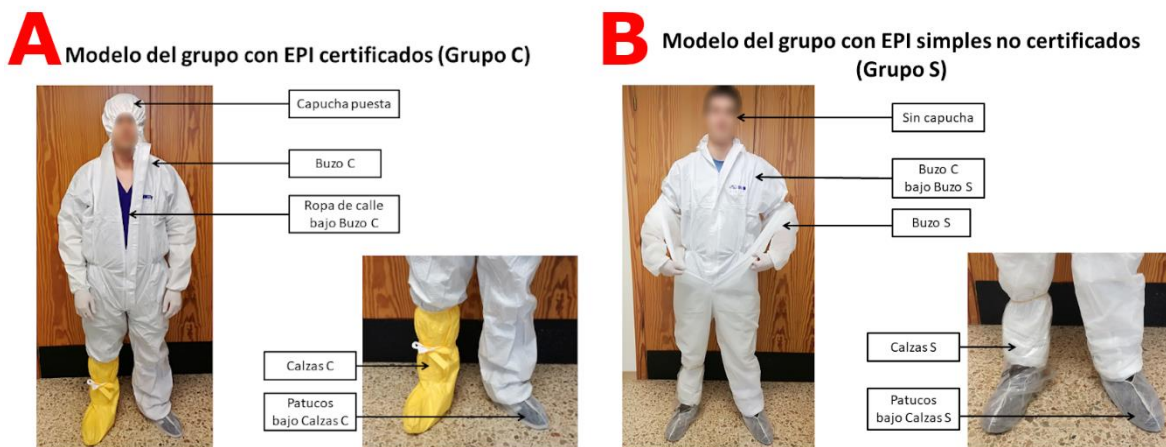
### 3.6. ESTUDIO 3: EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE LOS EQUIPOS DE PROTECCIÓN INDIVIDUAL (EPI) POR EL AMDV

Este estudio se realizó en dos partes diferenciadas: una aproximación preliminar en el año 2015 en la granja 610 y un ensayo más completo en 2017 en la granja 661, ambas del mismo propietario y además muy próximas entre sí (500 m). El tamaño y el censo de la granja 610 era de aproximadamente la mitad de la 661 en el periodo del estudio. Las dos explotaciones se infectaron en el año 2012 con la misma cepa de virus y presentaron una evolución similar de la prevalencia, habiendo operado desde entonces con infección endémica. En los últimos controles realizados mediante ELISA ambas obtuvieron prevalencias similares (37% en la granja 610 y 31% en la granja 661, realizados en octubre y diciembre de 2014 respectivamente)<sup>9</sup>.

En el ensayo preliminar de 2015 se evaluó la protección de diversos EPI vestidos por los diferentes miembros del equipo. Una persona vistió un único buzo desechable certificado (buzo C, Biztex® Microporous 6/5 Coverall, Portwest Ltd, Westport, Irlanda) que presentaba las certificaciones 14126 (barrera contra agentes infecciosos), EN ISO 13982-1 y EN 13034 (barrera contra partículas sólidas en suspensión y químicos líquidos), mientras otras dos personas se vistieron con buzos simples (buzo S, Ymbera Náyade S.L., Alicante, España) por encima de un buzo certificado; además, una cuarta persona del equipo, diferente de las anteriores, vistió un buzo certificado sin capucha. Para este ensayo se evaluó también en uno de los miembros del equipo una combinación de protección de calzado consistente en calzas de polipropileno no certificadas (Calzas S; Bastos Viegas S.A., Penafiel, Portugal) sobre patucos simples de polipropileno no certificados, por lo que no se evaluó ninguna protección certificada para el calzado en este ensayo.

Para el ensayo de 2017, seis personas del equipo de investigación se dividieron en dos grupos de tres miembros antes de entrar en la explotación, vistiendo cada grupo una combinación diferente de EPI (grupo de EPI certificados o grupo C, y grupo de EPI simples no certificados o grupo S). El grupo C se vistió con buzos desechables certificados (buzo C), utilizando además la capucha del buzo. Este grupo también vistió calzas desechables certificadas (calzas C; Tychem1 C, model POBA, DuPont, Wilmington, DE, Estados Unidos), con certificación EN 14126 (barrera contra agentes infecciosos), EN 863 (resistencia a la punción) y DIN EN ISO 13934-1 (resistencia a la tracción), que se colocaron por encima de unos patucos simples de polipropileno no certificados. El grupo S se vistió con un buzo simple no certificado (buzo S) que se colocó sobre un buzo C; además, los miembros de este grupo no se colocaron la capucha. Como protección del calzado, el grupo S se vistió con calzas no certificadas de polipropileno (Calzas S) que se colocaron por encima de unos patucos simples de polipropileno no certificados al igual que el grupo C. La figura 20 muestra un modelo de cómo se vistió cada grupo de este ensayo.

<sup>9</sup> La prevalencia al CIEP y al test ELISA (con valores cut-off calibrados para detección de animales infectados y en fase progresiva de la enfermedad) no son equivalentes, aunque en este caso sirven para poner de manifiesto la progresión de la infección en ese periodo de tiempo. En el momento del muestreo la explotación seguía operando con infección endémica y selección para tolerancia/resistencia usando el test ELISA y el test de yodo (según el año).



**Figura 20.** Esquema de la indumentaria vestida por cada miembro de los dos equipos de este estudio: A) Modelo del grupo con EPI certificados (Grupo C); B) Modelo del grupo con EPI simples no certificados (Grupo S).

La tabla 22 resume las muestras que se recogieron antes y después de la visita para la valoración de la contaminación de los EPI. La visita a la granja tuvo una duración de 30 y 60 minutos (años 2015 y 2017, respectivamente), tiempo durante el cual se recogieron en ambos ensayos muestras ambientales de jaulas y suelos para valorar la presencia ambiental de AMDV en las granjas. En los dos ensayos, la toma de muestras se realizó fuera de la granja al finalizar la visita, revisando además la integridad de los EPI antes de la recogida de las muestras. En 2015 se recogieron en total 16 muestras: 1 de ropa de calle antes de la visita, 4 muestras ambientales en la granja, 10 de los diferentes EPI, ropa/calzado y pelo y 1 muestra del suelo de la zona externa a la granja donde se muestrearon los EPI. En 2017 se recogieron 58 muestras: 15 muestras de ropa/calzado de calle y pelo antes de la visita, 6 muestras ambientales en la granja, 36 muestras de los diferentes EPI, ropa/calzado y pelo después de la visita y también 1 muestra del suelo de la zona externa a la granja donde se realizó la recogida de muestras de los EPI.



Tabla 22. Resumen del n° muestras recogidas de cada tipo en cada uno de los ensayos (2015 y 2017).

	2015		2017	
	GRUPO EPI CERTIFICADO	GRUPO EPI NO CERTIFICADO	GRUPO EPI CERTIFICADO	GRUPO EPI NO CERTIFICADO
<b>EPI, ropa/calzado y pelo</b>				
Ropa calle antes del muestreo	1	0	3	0
Buzo simple (S)	0	2	0	3
Buzo certificado (C)	1	2	3	3
Ropa de calle después del muestreo	1	0	3	0
Calzado calle antes del muestreo	0	1	3	3
Calzas certificadas (C)	0	0	3	0
Calzas simples (S)	0	1	0	3
Patucos	0	1	3	3
Calzado de calle final visita	0	1	3	3
Pelo antes del muestreo	0	0	3	3
Pelo después del muestreo	0	1	3	3
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>		<b>51</b>	
<b>Ambiente granja:</b>				
Jaulas	1		3	
Suelo naves	3		3	
Zona parking	1		1	
<b>TOTAL</b>	<b>5</b>		<b>7</b>	

Todas las muestras se procesaron utilizando el protocolo de extracción B y fueron analizadas mediante qPCR (3.3.1). Aquellas muestras que resultaron negativas a este primer análisis fueron de nuevo procesadas, pero esta vez empleando el protocolo de extracción A, y analizadas de nuevo a continuación mediante qPCR, buscando mediante este doble análisis en serie maximizar la posibilidad de detección de AMDV. A continuación, para cada tipo de muestra se determinó el número y porcentaje de muestras positivas, así como la media y rango del número de EG cuantificados por hisopo y el error estándar.

### **3.7. ESTUDIO 4: EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN EN EL SUROESTE DE EUROPA: ESTUDIO RETROSPECTIVO DEL PERIODO 2012-2020**

En este estudio se incluyeron 17 explotaciones de visón (14 de España, dos del noroeste de Portugal y una del suroeste de Francia) que presentaron infección por AMDV en algún momento durante el periodo comprendido entre enero de 2012 y febrero de 2020. Todas estas granjas habían sido identificadas como infectadas mediante el test CIEP que se realiza dentro del programa de control anual. Hay que mencionar que las granjas de Portugal y Francia se incluyeron en el estudio debido a su relación con el sector español y a su proximidad con la frontera española. De esta forma, para este estudio retrospectivo se localizaron todas las muestras disponibles de estas explotaciones en nuestro banco de muestras que previamente habían sido confirmadas como positivas a AMDV mediante la técnica de qPCR descrita anteriormente (apartado 3.3.1). Se seleccionaron dos tipos de muestras: muestras de bazo obtenidas de necropsias de animales CIEP positivos y muestras ambientales de diferentes elementos de las explotaciones que habían tenido contacto con animales positivos al CIEP. En la medida de lo posible, se intentó seleccionar al menos dos muestras de cada granja y año, aunque no fue posible en todos los casos; así, se seleccionaron 43 muestras para amplificación parcial mediante PCR convencional de los genes NS1 y VP2 y posterior secuenciación de los amplicones obtenidos (apartado 3.3.2). Además del trabajo de laboratorio, se categorizó el tipo de infección en cada granja y se recopiló información epidemiológica de cada una ellas, fundamentalmente el historial serológico de cada granja desde la década de 1990, la fecha de detección de la infección en el brote o brotes objeto de este estudio, y factores de riesgo como las relaciones comerciales o laborales con otras granjas (compra de animales o material de granja, trabajadores compartidos, visitantes) y distancia a otras granjas infectadas. La tabla 23 resume las muestras empleadas, la fecha de obtención y el tipo de infección de cada granja para el periodo 2012-2019.

Tabla 23. Clasificación y características de las muestras seleccionadas para este estudio.

Granja	Código muestra	Tipo de muestra	Fecha de recogida	País (región)	Tipo de infección*
540	540.1/2014	Nido	2014	España (centro)	Infección endémica hasta 2014 (erradicada mediante “ <i>stamping-out</i> ”)
542	542.1/2017	Jaula	2017	España (centro)	Infección endémica (cerrada en 2016)
	542.2/2017	Carro de sacrificio	2017		
545	545.1/2015	Bazo	2015	España (centro)	Infección endémica hasta 2012 (erradicada mediante “ <i>stamping-out</i> ”) Brote esporádicos recurrentes desde 2015
610	610.1/2013	Jaula	2013	España (noroeste Galicia)	Brote epizootico en 2012 (infección endémica desde entonces)
	610.2/2016	Guantes de sujeción	2016		
612	612.1/2014	Jaula	2014	España (noroeste Galicia)	Brote epizootico en 2014 (infección endémica desde entonces)
	612.2/2016	Carro de sacrificio	2016		
616	616.1/2016	Bazo	2016	España (noroeste Galicia)	Brote esporádico en 2016 (eliminado mediante “test y sacrificio”)
619	619.1/2013	Jaula	2013	España (noroeste Galicia)	Brote epizootico en 2013 (infección endémica desde entonces)
	619.2/2016	Guantes de sujeción	2016		
622	622.1/2014	Carro de sacrificio	2014	España (noroeste Galicia)	Brote epizootico en 2014 (infección endémica desde entonces)
	622.2/2014	Guantes de sujeción	2014		
	622.3/2016	Guantes de sujeción	2016		
	622.4/2016	Jaula	2016		
	622.5/2016	Carro de sacrificio	2016		
	622.6/2018	Guantes de sujeción	2018		
	622.7/2018	Nido	2018		
633	633.1/2018	Bazo	2018	España (noroeste Galicia)	Brote epizootico 2018 (“ <i>stamping-out</i> ” aún en ejecución en 2020)
	633.2/2018	Bazo	2018		
661	661.1/2013	Bazo	2013	España (noroeste Galicia)	Brote epizootico en 2012 (infección endémica desde entonces)
	661.2/2013	Bazo	2013		
	661.3/2013	Jaula	2013		
	661.4/2016	Carro de sacrificio	2016		

Tabla 23. Continuación.

Granja	Código muestra	Tipo de muestra	Fecha de recogida	País (región)	Tipo de infección*
672	672.1/2019	Bazo	2019	España (noroeste Galicia)	Brotos esporádicos en 2018-2020 (actualmente bajo estrategia “test y sacrificio”)
	672.2/2019	Bazo	2019		
	672.1/2020	Bazo	2020		
	672.3/2020	Bazo	2020		
936	936.1/2015	Bazo	2015	España (suroeste Galicia)	Brotos esporádicos en 2015, 2018 y 2019 (eliminados mediante “test y sacrificio”)
	936.2/2018	Bazo	2018		
	936.3/2018	Bazo	2018		
	936.1/2019	Bazo	2019		
	936.2/2019	Bazo	2019		
985	985.1/2015	Bazo	2015	España (suroeste Galicia)	Brote esporádico en 2015 (eliminado mediante “test y sacrificio”). Nuevo brote esporádico en 2020
	985.1/2020	Bazo	2020		
	985.2/2020	Bazo	2020		
6109	6109.1/2014	Carro de sacrificio	2014	España (noroeste Galicia)	Brote epizootico en 2014 (cerrada en 2015)
162	162.1/2018	Guantes de sujeción	2018	Portugal (frontera noroeste)	Brote epizootico en 2014. Infección endémica desde entonces (cerrada en 2018)
	162.2/2018	Jaula	2018		
1130	1130.1/2018	Guantes de sujeción	2018	Portugal (frontera noroeste)	Brote epizootico en 2014. Infección endémica desde entonces (cerrada en 2018)
	1130.2/2018	Jaula	2018		
382	382.1/2014	Nido	2014	Francia (suroeste)	Brote epizootico 2013 (eliminado mediante “ <i>stamping-out</i> ” en 2015)
	382.2/2015	Carro de sacrificio	2015		

\*Brote esporádico: granjas que presentan inicialmente sólo unos pocos positivos aislados, muestran una baja propagación de la infección (prevalencia < 2%) y siguen alguna estrategia de erradicación, generalmente del tipo “test y sacrificio”. Brote epizootico: granjas con una rápida propagación de la infección, alcanzando una alta prevalencia (>30%) en unos pocos meses; la infección, o bien se elimina mediante “*stamping-out*” o bien se convierte en infección endémica. Infección endémica: granjas con alta prevalencia durante varios años, que normalmente seleccionan para resistencia/tolerancia mediante test de yodo o ELISA.

Una vez obtenidas las secuencias para ambas dianas moleculares se procedió a realizar el análisis filogenético. En primer lugar, se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas para cada diana mediante el algoritmo de alineamiento múltiple ClustalW incluido en el software BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Una vez alineadas, se procedió al recorte de las mismas para obtener secuencias de igual longitud y a continuación se calculó una matriz de homologías para cada gen empleando el mismo software. Las secuencias 100% idénticas para la misma granja y año se eliminaron con el fin de simplificar los árboles filogenéticos. Se

construyeron cinco árboles filogenéticos, tres de ellos únicamente con las secuencias de este estudio (NS1 y VP2 por separado y concatenadas) y dos más incluyendo otras secuencias previamente descritas en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (254 y 77 secuencias previas para NS1 y VP2 respectivamente; anexos I y II). Además, en cada alineamiento se incluyó una secuencia del amdoparvovirus del zorro gris (nº de acceso de GenBank JN202450) a fin de enraizar el árbol y poder inferir posibles relaciones ancestrales. Una vez contruidos los cinco conjuntos de datos, se seleccionó el modelo de sustitución nucleotídica más adecuado para cada uno de ellos utilizando el Akaike Information Criterion (AIC) implementado en jModelTest v.2.1.10 (Guindon y Gascuel, 2003; Darriba *et al.*, 2012). Los árboles filogenéticos se construyeron con el software MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012) mediante la aproximación Bayesiana del método de cadena de Markov-Monte Carlo, utilizando una cadena de 10.000.000 repeticiones con muestreo cada 1.000 (10.000 muestras en total). Los árboles se visualizaron y se editaron posteriormente mediante el software FigTree 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).







## **CAPÍTULO 4**

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





#### 4.1. ESTUDIO 1: APLICACIÓN DEL QPCR PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA EN MUESTRAS AMBIENTALES DE GRANJA

La eficiencia de reacción fue del 99,21% y la curva estándar (ecuación de regresión:  $y = 37,789 + 3,341x$ ) mostró un ajuste muy bueno ( $R^2 = 0,999$ ) (Figura 21). Todas las muestras ( $n = 20$ ) de las granjas libres de AMDV (A1 – A5) y de la granja en riesgo de reinfección (B1) resultaron negativas. En la tabla 24 se muestran los resultados obtenidos en aquellas granjas con infección confirmada (D1, D2 y D3) y en la granja en alto riesgo de nueva infección (C1) por compartir un trabajador con una de las granjas positivas de este estudio. El rango del número de copias fluctuó entre  $6,9 \times 10^3$  y  $6,9 \times 10^7$  EG/hisopo, siendo más alto en muestras de heces o de superficies en contacto directo con animales (paredes de la jaula, guantes de trabajo) y más bajo en muestras de las huellas de las ruedas de camión, rotaluvio, efluentes y silo.

Se detectó la presencia de AMDV en el 93,9% de las muestras ambientales de las granjas con infección confirmada; los tres únicos resultados negativos en estas granjas se obtuvieron en las muestras de las huellas de las ruedas de camión en dos granjas (D1 y D2) y en una muestra de heces de la tercera granja (D3). En la granja C1 (en riesgo de nueva infección), las muestras de calzado, ropa y vehículo utilizados por el trabajador para trasladarse de una granja a otra dieron positivo, al igual que la muestra tomada del comedor/área de reunión.

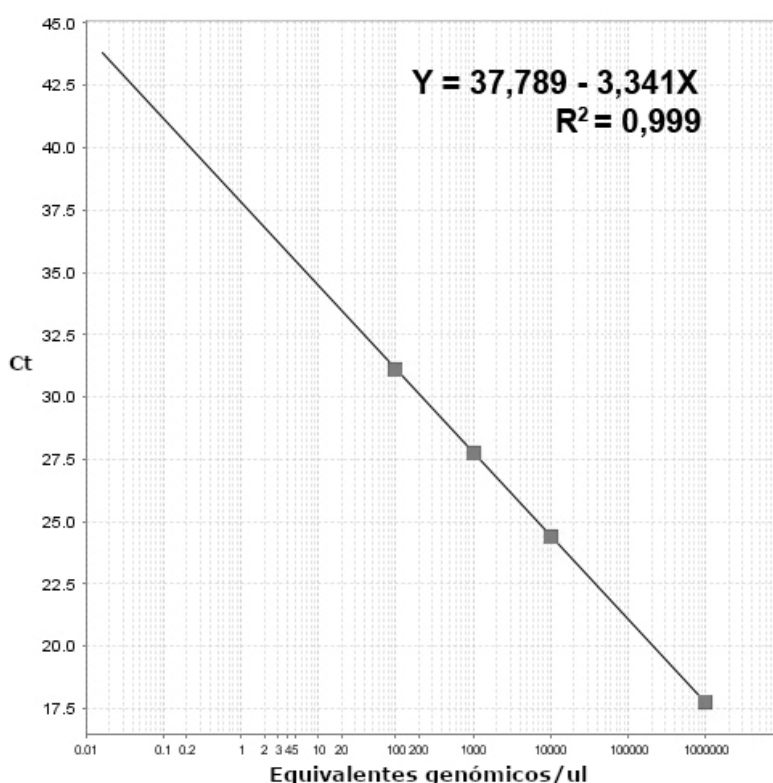


Figura 21. Curva estándar obtenida mediante qPCR a partir de los patrones de AMDV con concentración conocida.

**Tabla 24. Resultados obtenidos por PCR de las muestras ambientales tomadas de granjas con riesgo de infección y con infección confirmada por el AMDV. Los resultados de recuento se expresan como la media del n° de equivalentes genómicos/hisopo para cada tipo de muestra.**

Muestra	Granjas con infección confirmada a AMDV				Granja en riesgo de nueva infección
	D <sub>1</sub> N° posit./total (recuento)	D <sub>2</sub> N° posit./total (recuento)	D <sub>3</sub> N° posit./total (recuento)	Total N° posit./total (% posit.)	C <sub>1</sub> N° posit./total (recuento)
Silo de alimento	1 / 1 (1,0 x 10 <sup>4</sup> )	1 / 1 (3,2 x 10 <sup>5</sup> )	1 / 1 (2,0 x 10 <sup>6</sup> )	3 / 3 (100)	0 / 1
Suelo: huellas de rodada de camión	0 / 1	0 / 1	1 / 1 (6,9 x 10 <sup>3</sup> )	1 / 3 (33)	0 / 1
Jaulas	3 / 3 (2,5 x 10 <sup>5</sup> )	2 / 2 (3,0 x 10 <sup>7</sup> )	4 / 4 (6,9 x 10 <sup>7</sup> )	9 / 9 (100)	N/D
Heces	2 / 2 (2,8 x 10 <sup>5</sup> )	2 / 2 (2,5 x 10 <sup>6</sup> )	4 / 5 (3,5 x 10 <sup>7</sup> )	8 / 9 (88,9)	N/D
Efluentes	1 / 1 (1,7 x 10 <sup>4</sup> )	2 / 2 (7,5 x 10 <sup>3</sup> )	2 / 2 (2,1 x 10 <sup>4</sup> )	5 / 5 (100)	0 / 2
Rotaluvio	N/D	1 / 1 (10)	N/D	1 / 1 (100)	N/D
Zona de descanso y reunión de personal	N/D	3 / 3 (6,1 x 10 <sup>5</sup> )	1 / 1 (2,9 x 10 <sup>6</sup> )	4 / 4 (100)	1 / 1 (2,6 x 10 <sup>4</sup> )
Calzado de calle	N/D	1 / 1 (1,5 x 10 <sup>5</sup> )	1 / 1 (8,0 x 10 <sup>5</sup> )	2 / 2 (100)	1 / 1 (4,7 x 10 <sup>6</sup> )
Ropa de calle	N/D	1 / 1 (8,1 x 10 <sup>5</sup> )	1 / 1 (6,0 x 10 <sup>6</sup> )	2 / 2 (100)	1 / 1 (11,5 x 10 <sup>5</sup> )
Almacenes	N/D	1 / 1 (1,1 x 10 <sup>5</sup> )	3 / 3 (5,4 x 10 <sup>5</sup> )	4 / 4 (100)	0 / 2
Guantes de sujeción	N/D	1 / 1 (7,0 x 10 <sup>6</sup> )	1 / 1 (3,7 x 10 <sup>7</sup> )	2 / 2 (100)	N/D
Vehículos	N/D	1 / 1 (6,2 x 10 <sup>5</sup> )	2 / 2 (6,0 x 10 <sup>5</sup> )	3 / 3 (100)	1 / 1 (4,1 x 10 <sup>4</sup> )
Buzos desechables	N/D	N/D	1 / 1 (7,6 x 10 <sup>5</sup> )	1 / 1 (100)	N/D
Calzado de trabajo	N/D	N/D	1 / 1 (2,2 x 10 <sup>5</sup> )	1 / 1 (100)	N/D
<b>TOTAL</b>	<b>7 / 8</b>	<b>16 / 17</b>	<b>23 / 24</b>	<b>46 / 49</b>	<b>4 / 10</b>

Estos resultados son, hasta donde sabemos, la primera demostración de contaminación ambiental por AMDV en superficies de diversa naturaleza dentro de o asociadas a granjas de visones con infección confirmada o bajo un riesgo de infección cierto, definido y muy específico (trabajador compartido con una granja infectada). La detección por qPCR es una herramienta útil en el estudio de la epidemiología de las enfermedades virales ya que, a diferencia del caso de las bacterias, no existen métodos aceptados de cultivo estándar para cuantificar los virus en muestras ambientales (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012); esto es aún más aplicable en el caso del ADMV, donde no hay métodos de cultivo eficaces para las cepas de campo (Knuuttila, 2015). La detección y cuantificación de virus en superficies es importante para comprender la distribución de agentes infecciosos en el medio ambiente y el papel de los fómites en la transmisión de enfermedades (Julian *et al.*, 2011). Los resultados negativos en todas las granjas negativas, unidos al alto porcentaje de resultados positivos en granjas infectadas, demuestran la viabilidad de estudiar la contaminación ambiental por AMDV mediante qPCR; de este modo, esta técnica puede contribuir a una mejor caracterización del reservorio ambiental de este virus, considerado por algunos autores como la causa principal del fracaso de los programas de erradicación (Cepica *et al.*, 2012; Cepica y Iwamoto, 2012; Cepica, 2016). Es de resaltar que, como era esperable, las muestras de superficies en contacto directo con animales infectados generalmente obtuvieron un mayor recuento de EG que otros tipos de muestras. Con todo, hay que señalar que una limitación de esta técnica es que la detección del genoma vírico por sí sola no nos aporta información sobre la capacidad infecciosa del mismo, puesto que puede tratarse de partículas víricas que han perdido ya su capacidad infectiva o de restos del ADN vírico liberado de las cápsides. No obstante, dada la elevada resistencia ambiental del AMDV (Hahn *et al.*, 1977; Eterpi *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2014), cabe pensar que la correlación entre los EG detectados por la qPCR y las partículas realmente infectivas sea alta.

Dado que el AMDV causa generalmente infecciones persistentes (Larsen y Porter, 1975; Hadlow *et al.*, 1983), el primer paso en cualquier campaña de erradicación es la detección y eliminación de los animales infectados (“test y sacrificio”) o el sacrificio de toda la cabaña (“*stamping-out*”). La todavía, a día de hoy, incierta sensibilidad del test CIEP unida a la variabilidad individual en la producción de anticuerpos han sido señaladas como posibles causas del fracaso de los sistemas de erradicación (Farid *et al.*, 2012; Farid y Hussain, 2020); incluso la total despoblación de una granja, desinfección y repoblación con una cabaña negativa, está sujeta a fracasos debido a la posible presencia de animales positivos que hayan pasado inadvertidos en la granja de origen (Cepica *et al.*, 2012). Otro factor importante a encarar en los programas de erradicación es la carga ambiental del virus en granjas infectadas, que viene asegurada por la eliminación del virus a través de todos los fluidos corporales (Gorham *et al.*, 1976; Haagsma y Bokhout, 1980; Jensen *et al.*, 2014; Farid y Hussain, 2019) y por su alta resistencia ambiental (Eklund *et al.*, 1968; Hahn *et al.*, 1977), pudiendo permanecer viable en el terreno y ambiente de la granja durante años pese a las labores de limpieza y desinfección implementadas (Hansen, 1988). Por todo ello, cuando se aplican programas de erradicación del AMDV (tanto los basados en el sistema “test y sacrificio” como en el sistema “*stamping-out*”) se producen dificultades, e incluso fracasos, que

conducen a rebrotes de la enfermedad y que a la postre desincentivan la adhesión a dichos programas y la elección del granjero a coexistir con una infección endémica. Por consiguiente, el estudio del reservorio ambiental mediante la detección del ADN viral en las diferentes zonas y elementos de la granja es un paso importante hacia la asociación de los fómites con el riesgo de infección y resurgimiento de la enfermedad.

Pese al hecho reconocido de la alta persistencia ambiental del AMDV, hasta ahora sólo ha sido posible evaluar la presencia del virus en el ambiente de una granja, superficies y equipos mediante su detección en animales una vez la infección se había ya producido o, en trabajos experimentales, mediante la infección experimental en animales susceptibles (genotipos aleutianos). La detección del virus en diferentes elementos testados en la granja C1 en julio de 2013 y la posterior seroconversión en mayo de 2014 muestran que es posible en determinados casos detectar el virus en el ambiente antes de que se produzca la infección del rebaño. Trabajos posteriores han mostrado también que los test ambientales pueden predecir y alertar de la infección de una granja antes del periodo de test serológicos estacionales, con un coste y mano de obra muy inferiores al que supone la realización de serológicos adicionales (datos propios no publicados), haciendo posible la anticipación a las campañas serológicas estacionales y pudiendo realizarse además con un riesgo muy inferior de diseminación del agente infeccioso.

Nuestros resultados son también consistentes con la persistencia de la contaminación ambiental por AMDV en las granjas positivas. Se ha demostrado que la presencia de infección por AMDV en una granja la temporada anterior es un parámetro de riesgo significativo para su recurrencia a pesar de sacrificar a todos los animales al final de la temporada; este hecho, unido a la elevada homología descrita entre cepas que emergen en esas granjas durante temporadas consecutivas, sugiere que la inactivación inadecuada del AMDV en el ambiente de las granjas es un factor altamente significativo en el fracaso de los programas de erradicación (Christensen *et al.*, 2011). Así, la presencia de virus en las superficies, materiales de granja y terreno de las granjas con infección confirmada puede constituir no sólo una ruta de infección que contribuye al incremento de la prevalencia en las granjas infectadas, sino también un obstáculo en el éxito de los programas de erradicación en este tipo de explotaciones. Nuestros resultados muestran además que la contaminación ambiental abarca una multiplicidad de elementos, tanto en contacto directo como indirecto con los animales, que deben ser tenidos en cuenta al evaluar los riesgos y diseñar los programas de limpieza y desinfección.

Aunque los programas de control de la enfermedad incluyen restringir el transporte de animales desde granjas sospechosas e infectadas, puesto que es una fuente frecuente de transmisión de la infección entre granjas (Hansen, 1980), no es raro que se produzca una reinfección en granjas libres de AMDV. Una de las causas posibles, la transmisión aerógena, aún no ha sido demostrada y los resultados de varios estudios sugieren que no juega un papel importante en la transmisión entre granjas (Christensen *et al.*, 2011; Espregueira Themudo *et al.*, 2012). La infección a partir de la fauna silvestre ha sido demostrada en diversos trabajos, pero su importancia depende del nivel de infección de estos animales en el área concreta



(Farid *et al.*, 2012). Además de estas posibles vías de transmisión, nuestros resultados sustentan la sospecha previa, basada en evidencias epidemiológicas, de que la transmisión entre granjas puede ocurrir a través de la ropa, el calzado y los vehículos (Christensen *et al.*, 2011; Farid *et al.*, 2012), así como a través de material compartido o comprado de segunda mano (Chriél, 2000a; Espregueira Themudo *et al.*, 2012). Además de las muestras de ropa, calzado y vehículo, una muestra del comedor/área de reunión resultó positiva en la granja C1, documentando así el extremo riesgo epidemiológico que asumió este granjero al trabajar simultáneamente en una granja positiva y otra negativa y también el papel de los fómites en la reintroducción de la infección en una granja negativa. Después de este estudio, esta granja fue clasificada como positiva para AMDV mediante la prueba CIEP en mayo de 2014, con un 17% de prevalencia (datos propios no publicados). Posteriormente, la secuenciación de las cepas aisladas en esta granja demostró que estas eran prácticamente idénticas a las aisladas en la granja previamente positiva, como un 100% y  $\geq 99.6\%$  de homología para los genes NS1 y VP2 respectivamente (ver estudio 4), por lo que todo apunta a que la infección de esta granja siguió la ruta que sugiere el presente estudio. Por tanto, estos resultados resaltan la relevancia de la contaminación del personal en la propagación del virus y la necesidad de seguir cuidadosamente las medidas de bioseguridad.

En la granja B1, donde se había llevado a cabo un procedimiento de eliminación de todos los animales seguido de limpieza y desinfección (“*stamping-out*”), todas las muestras resultaron negativas, lo que concuerda con la evolución posterior de dicha granja, donde no se volvieron a detectar animales positivos tras su repoblación en abril de 2013 hasta su cierre en diciembre de 2015 (tres serologías al total de la cabaña reproductora). Aunque no incluidos en los datos de esta tesis, la posterior monitorización de otras dos granjas durante la fase de limpieza y desinfección aplicada al final de los procesos de “*stamping-out*” arrojó resultados positivos en algunas zonas de la granja al final de dicho proceso (madera de los nidos, elementos textiles en el comedor/sala de reunión y máquinas de la zona de peletización, todos ellos de difícil limpieza y desinfección), dando así una segunda oportunidad para completar con éxito el proceso de desinfección antes de la reentrada de los animales, lo que finalmente se consiguió (datos propios no publicados). En otras infecciones virales se ha descrito que, mediante el uso de protocolos apropiados, la degradación del genoma viral por desinfectantes se puede estimar determinando la concentración o presencia de genoma amplificable antes y después de la exposición a un desinfectante (Rodríguez *et al.*, 2009). Nuestros resultados, aunque limitados, muestran la potencial utilidad práctica de estos análisis de muestras ambientales mediante qPCR para evaluar el impacto de intervenciones de control sobre la contaminación ambiental, como se está haciendo con diversas infecciones humanas a nivel hospitalario (Gallimore *et al.*, 2008).

No obstante, debe hacerse constar aquí que no es lo mismo detectar la presencia del AMDV en el contexto de una granja infectada si la prevalencia es lo suficientemente alta (como es el caso de las granjas positivas de este estudio) que detectar reservorios aislados en el contexto de una granja donde los animales no se han infectado todavía o cuando la prevalencia es muy baja. En estos casos, el éxito de la detección ambiental dependerá de si

conocemos de antemano cuál es el riesgo y éste se materializa en elementos muy concretos susceptibles de ser muestreados de un modo exhaustivo, como en el caso de la granja C1. Lo mismo es de aplicación en la monitorización de una granja después del proceso de limpieza y desinfección, donde se precisa de un exhaustivo conocimiento de los puntos críticos del proceso y las condiciones concretas de cada granja para diseñar un programa de muestreo con ciertas garantías de obtención de resultados realmente significativos. En relación con esto último, este tipo de estudios sirven de ayuda para conocer e identificar cuáles son los puntos críticos más frecuentes. En la mayoría de los intentos realizados para detectar el virus en el ambiente alrededor de animales infectados en granjas con brotes esporádicos de uno o unos pocos positivos aislados no fue posible demostrar su presencia, lo que nos lleva a pensar que no es sencillo evidenciar el reservorio ambiental cuando las cargas víricas son muy bajas o su distribución es incierta (datos propios propios no publicados).

Por lo tanto, la qPCR es una técnica útil para la detección y cuantificación del AMDV con el fin de evaluar la contaminación ambiental en las granjas de visones, lo que puede tener potencialmente importantes aplicaciones tanto en los estudios epidemiológicos como en los programas de control de la AD, complementando así la detección de la infección en animales. Además, esta herramienta permite “visibilizar” los riesgos, lo que puede ser utilizado en los programas de formación, ayudando a aumentar el compromiso de los granjeros con las medidas de bioseguridad. Por otro lado, la detección y cuantificación del AMDV en muestras ambientales de granjas es el primer paso para establecer protocolos de evaluación del impacto de las medidas de control en la contaminación ambiental, estudiar eventuales rutas de transmisión y evaluar riesgos antes de que se materialicen en infecciones activas.

El presente capítulo de esta tesis (4.1) reproduce contenidos de la siguiente publicación:

Prieto, A., Díaz-Cao, J.M., **Fernández-Antonio, R.**, Panadero, R., Díaz, P., López, C., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Fernández, G. 2014. Application of real time PCR to detect Aleutian Mink Disease Virus on environmental farm sources. *Vet. Microbiol.* 173, 355-359. Editorial: Elsevier (ISSN: 0378-1135).

#### 4.2. ESTUDIO 2: DISTRIBUCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN EN EL AMBIENTE DE GRANJAS INFECTADAS

En este estudio, 75 de 114 muestras dieron positivo por ambos métodos de extracción de ADN, mientras que 4 de 114 sólo mostraron resultados positivos mediante el método A y 18 de 114 sólo mediante el método B; así, el método A detectó menos muestras positivas que el método B (69,3% y 81,6% respectivamente). El número de equivalentes genómicos se calculó mediante la curva estándar obtenida ( $y = 37,207 - 3,318x$ ;  $R^2 = 0,999$ ; eficiencia = 100,18%). Los resultados de la cuantificación de AMDV para los métodos de extracción de ADN A y B se resumen en la tabla 25. Como se muestra en la figura 22, se obtuvo una mayor contaminación para las primeras categorías (en contacto directo con animales o más cerca de ellos) que en las últimas (más alejadas de los animales). Para el método A, el análisis *post-hoc* reveló diferencias significativas entre “Jaulas” con respecto a “Calle” ( $p = 0,022$ ), “Efluentes” ( $p = 0,004$ ) y “Periferia” ( $p = 0,007$ ), y entre “Guantes de sujeción” con respecto a “Efluentes” ( $p = 0,026$ ) y “Periferia” ( $p = 0,044$ ). Por otro lado, el método B mostró la existencia de diferencias significativas entre “Jaulas” con respecto a “Efluentes” ( $p = 0,011$ ) y “Periferia” ( $p = 0,016$ ), y entre “Suelo/Estiércol” con respecto a “Efluentes” ( $p = 0,033$ ).

Con respecto a los dos métodos de extracción de ADN utilizados, el grado de concordancia entre ambos métodos para clasificar todas las muestras como positivas o negativas mostró un valor kappa de 0,49, que corresponde con un nivel de concordancia "moderado" (Landis y Koch, 1977). Además, la prueba de McNemar encontró diferencias estadísticamente significativas entre las clasificaciones (positivo/negativo) obtenidas por cada método ( $p = 0,004$ ). Finalmente, teniendo en cuenta las 75 muestras positivas por ambos métodos de extracción de ADN, el log10 del número de equivalentes genómicos fue significativamente mayor para el método B que para el método A (5,72 y 4,98, respectivamente;  $p < 0,001$ ).

**Tabla 25. Resultados de cuantificación del virus de la enfermedad aleutiana del visón en cada categoría de muestras por los métodos de extracción A y B. Valores expresados en nº de equivalentes genómicos/hisopo.**

Categoría nº	Categoría	Nº muestras positivas (%)	Media de EG/hisopo	Error estándar de la media	Rango
1 A	Jaulas	14/14 (100%)	1,6x10 <sup>7</sup>	9,5x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>8</sup> - 2,7x10 <sup>3</sup>
1 B		14/14 (100%)	2,7x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>	1,3x10 <sup>8</sup> - 1,2x10 <sup>4</sup>
2 A	Suelo/Estiércol	9/9 (100%)	3,2x10 <sup>6</sup>	2,8x10 <sup>6</sup>	2,6x10 <sup>7</sup> - 1,6x10 <sup>3</sup>
2 B		9/9 (100%)	9,1x10 <sup>6</sup>	4,0x10 <sup>6</sup>	3,3x10 <sup>7</sup> - 4,0x10 <sup>3</sup>
3 A	Guantes de sujeción	6/11 (54,5%)	7,9x10 <sup>5</sup>	5,1x10 <sup>5</sup>	3,4x10 <sup>6</sup> - 3,7x10 <sup>4</sup>
3 B		11/11 (100%)	4,3x10 <sup>6</sup>	3,4x10 <sup>6</sup>	3,7x10 <sup>7</sup> - 1,2x10 <sup>4</sup>
4 A	Carro de sacrificio	5/8 (62,5%)	3,8x10 <sup>5</sup>	2,7x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>6</sup> - 7,3x10 <sup>3</sup>
4 B		7/8 (87,5%)	7,6x10 <sup>5</sup>	3,2x10 <sup>5</sup>	2,5x10 <sup>6</sup> - 3,5x10 <sup>4</sup>
5 A	Dependencias	12/18 (66,7%)	4,1x10 <sup>5</sup>	3,4x10 <sup>5</sup>	4,2x10 <sup>6</sup> - 5,0x10 <sup>3</sup>
5 B		15/18 (83,3%)	9,1x10 <sup>5</sup>	4,1x10 <sup>5</sup>	6,1x10 <sup>6</sup> - 1,6x10 <sup>4</sup>
6 A	Visitas	11/11 (100%)	1,3x10 <sup>5</sup>	5,5x10 <sup>4</sup>	6,5x10 <sup>5</sup> - 1,8x10 <sup>3</sup>
6 B		10/11 (90,9%)	2,3x10 <sup>5</sup>	8,8x10 <sup>4</sup>	7,6x10 <sup>5</sup> - 3,2x10 <sup>4</sup>
7 A	Calle	9/12 (75%)	5,2x10 <sup>4</sup>	2,4x10 <sup>4</sup>	2,0x10 <sup>5</sup> - 4,4x10 <sup>3</sup>
7 B		12/12 (100%)	6,8x10 <sup>5</sup>	3,8x10 <sup>5</sup>	4,7x10 <sup>6</sup> - 5,4x10 <sup>2</sup>
8 A	Efluentes	5/16 (31,3%)	1,4x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>3</sup>	3,0x10 <sup>4</sup> - 3,6x10 <sup>3</sup>
8 B		5/16 (31,3%)	3,4x10 <sup>4</sup>	2,8x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>5</sup> - 6,8x10 <sup>2</sup>
9 A	Periferia	8/15 (53,3%)	1,9x10 <sup>4</sup>	3,7x10 <sup>3</sup>	3,5x10 <sup>4</sup> - 6,0x10 <sup>3</sup>
9 B		10/15 (66,7%)	2,7x10 <sup>5</sup>	1,9x10 <sup>5</sup>	2,0x10 <sup>6</sup> - 7,5x10 <sup>3</sup>

A pesar de la implementación de programas de control basados en estrategias de "test y sacrificio" o "*stamping-out*" durante las cinco últimas décadas, el AMDV no se ha erradicado en la mayoría de los países productores de visón, principalmente debido a la persistencia de la infección, la introducción de nuevas infecciones en granjas y una comprensión incompleta de las fuentes de recontaminación, todo lo cual predispone a rebrotes de la enfermedad tras el proceso de erradicación (Espregueira Themudo *et al.*, 2011; Farid *et al.*, 2012; Farid y Hussain, 2020). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la existencia de diferencias en la distribución de la contaminación por AMDV entre diferentes zonas o elementos de las granjas infectadas, proporcionando información valiosa para identificar desde zonas de contaminación marginal hasta fómites altamente contaminados; por tanto, este estudio en conjunto aporta una información de gran valor para establecer mejor los riesgos, tanto de diseminación de la enfermedad dentro de la granja como de infección de otras explotaciones. Sin embargo, se deben considerar dos aspectos importantes relacionados con este estudio. En primer lugar, las granjas analizadas se muestrearon durante la fase epizootica de infecciones recientes (6-12 meses del inicio del brote), por lo que cabe suponer una mayor carga vírica ambiental en dicha fase en comparación con la que podría encontrarse en granjas

con infección endémica una vez se alcanza un equilibrio entre el patógeno y la resistencia/tolerancia del hospedador; de hecho, muestreos posteriores en alguna de estas granjas ya en fase de infección endémica han arrojado cargas víricas inferiores (datos propios no publicados). Por esta razón, en este trabajo sólo se seleccionaron granjas con infección reciente y de rápida propagación, a fin de que pudiesen ser comparables entre sí. En segundo lugar, la presencia de ADN del AMDV no debe interpretarse directamente como "unidades infectivas", ya que su detección no implica infectividad. Sin embargo, la resistencia de los parvovirus como el AMDV es bien conocida, pudiendo sobrevivir a un amplio rango de temperaturas y diferentes desinfectantes durante prolongados periodos de tiempo (Hahn *et al.*, 1977; Eterpi *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2014). En consecuencia, la detección de ADN del AMDV en el entorno de granjas de visones infectadas debe considerarse como un verdadero riesgo debido a la alta probabilidad de que los viriones mantengan su viabilidad.

La categorización de las muestras se estableció principalmente de acuerdo con su ubicación y también teniendo en cuenta la naturaleza de cada muestra. Como se puede observar en la tabla 21 (apartado 3.5), algunas categorías presentan cierta heterogeneidad, como "Dependencias" o "Periferia"; sin embargo, el objetivo principal de esta agrupación fue definir diferentes grupos de muestras en función de la proximidad/lejanía a los animales, considerados como la fuente de contaminación primaria. De esta manera, las primeras cuatro categorías representan elementos de la granja o áreas en contacto directo con los animales o muy cerca de ellos ("Jaulas", "Suelo/Estiércol", "Guantes de sujeción" y "Carro de matanza"), mientras que las categorías 5 y 8 ("Dependencias" y "Efluentes") representan otros elementos/áreas que, a pesar de pertenecer al recinto interior de la granja, no entran en contacto directo con los animales. Las muestras de la última categoría, "Periferia", representan tanto el área como elementos externos de la granja, tales como la plataforma de maniobra para camiones y los silos de pienso. La categoría "Calle" representa los elementos usados por los trabajadores de la granja que, como los vehículos y el calzado y ropa de calle, son utilizados fuera de la explotación. Dicha categoría junto con la de "Visitantes" representan a las personas y elementos que pueden moverse entre el resto de categorías e incluso a otros lugares como otras granjas o locales relacionados con el sector del visón, como dependencias anexas de la granja, plantas de peletización o fábricas de pienso. En este estudio, se detectó ADN del AMDV en muestras de todas las categorías independientemente del método de extracción de ADN utilizado, lo que demuestra una alta propagación del ADN del AMDV en el entorno de granjas positivas. Como cabía esperar, el número medio de equivalentes genómicos de AMDV disminuyó con ambos protocolos desde la primera hasta la última categoría, es decir, a medida que dichas categorías se van alejando de los animales (Figura 22). Además, el 100% de las muestras en las dos primeras categorías fueron positivas, mientras que el porcentaje de detección en las últimas fue menor, aunque también muy elevado (Tabla 25). Estos hallazgos, junto con las diferencias significativas en el número de equivalentes genómicos recuperados entre la primera y la última categoría, parecen indicar la existencia de un gradiente de contaminación por AMDV que disminuye desde los elementos/áreas más cercanos a los animales hasta los puntos más lejanos.

Aunque las categorías en contacto directo con animales (1–4) presentaron la mayor carga de AMDV, también se detectaron valores elevados en otras categorías, como “Dependencias”, “Visitantes” y “Calle”. Con respecto a las categorías “Guantes de sujeción” y “Carro de sacrificio”, es importante tener en cuenta que estos elementos entran en contacto con muchos animales a lo largo de los ciclos de trabajo en la granja y son en principio buenos candidatos para detectar nuevas infecciones antes de la realización del test serológico anual (datos propios no publicados). La categoría “Jaulas” representa elementos que pueden ser usados por diferentes animales a lo largo del ciclo productivo, jugando un papel importante en la transmisión horizontal; además son elementos susceptibles de ser vendidos como material de segunda mano a otras explotaciones y son por lo tanto un vehículo potencial de transmisión entre granjas. En el caso de “Dependencias” (almacenes, vestuarios, comedores), los resultados presentados aquí resaltan la importancia de contemplarlos en detalle cuando se elaboran los procedimientos de limpieza y desinfección ya que suelen requerir de procedimientos específicos y diferentes a los del resto de la granja, pudiendo fácilmente actuar como reservorios ocultos que no se manifestarán de inmediato al no estar en contacto directo con los animales pero que podrían dar lugar a brotes posteriores incluso después de un proceso de “*stamping-out*”. Con respecto a la categoría “Calle”, nuestros resultados muestran que la ropa, el calzado de la calle y los vehículos de los trabajadores se contaminan con AMDV alcanzando recuentos considerables. Estos resultados sugieren que los trabajadores tienen un alto potencial para transferir el virus entre diferentes zonas de la granja, así como a su ropa/calzado de calle y vehículos. Por esta razón, los elementos representados en esta categoría tienen una gran importancia como vector de contagio y como reservorio de virus durante los procedimientos de limpieza y desinfección, planteando además problemas de bioseguridad para otras granjas debido a su movilidad. En el caso de la categoría “Visitantes”, los buzos y las calzas se contaminan durante la visita a la granja con un nivel de contaminación seguramente condicionado no solo por el nivel de contaminación ambiental en las zonas visitadas, sino también por el tiempo de exposición y las tareas desarrolladas; en el caso de este estudio, 30-60 minutos recorriendo las naves de los animales sin manipulación de ningún tipo sobre ellos fueron suficientes para detectar la contaminación de estos equipos de protección. Esto también indica un riesgo significativo de bioseguridad, ya que las personas pueden visitar varias granjas el mismo día; por tanto, el uso de equipo de protección personal adecuado resulta crítico para todos los visitantes de las granjas, y especialmente en las granjas infectadas.



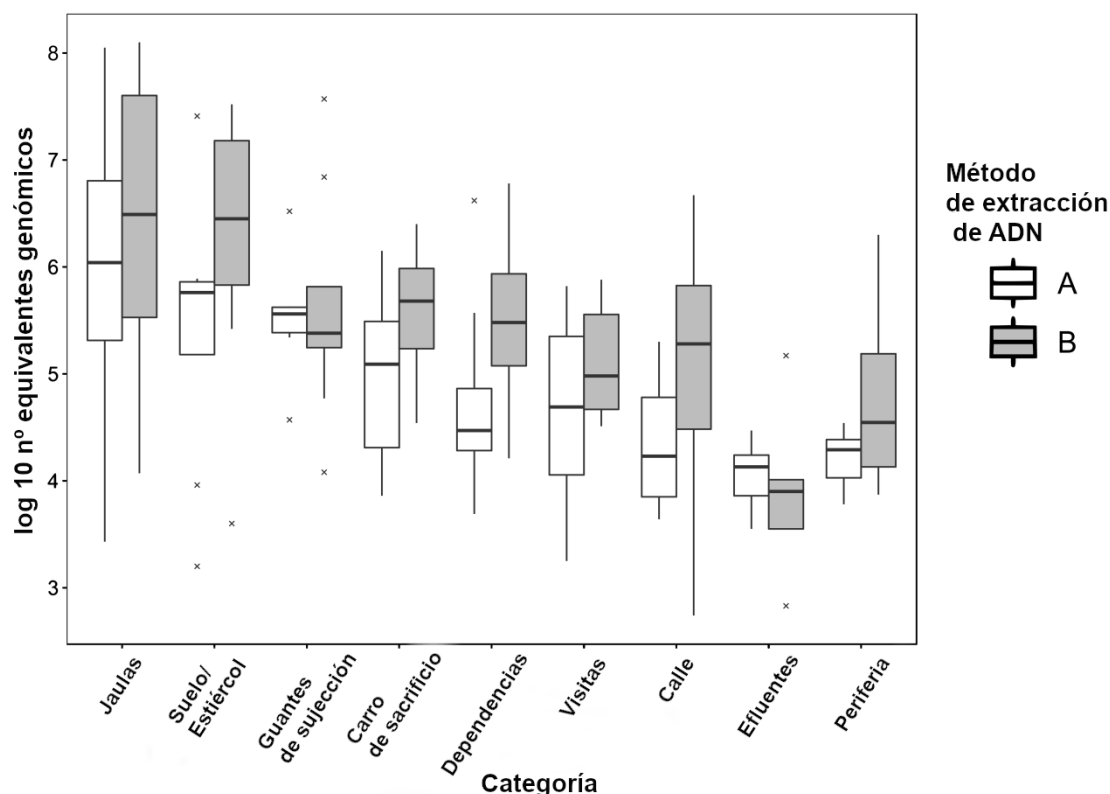


Figura 22. Diagrama de cajas representando la distribución del ADN del virus de la enfermedad aleutiana del vison obtenido con los métodos de extracción A y B en cada categoría de muestras.

Los niveles más bajos de AMDV se detectaron en las dos últimas categorías, "Efluentes" y "Periferia". Los "Efluentes" representan las salidas de agua de la granja, incluidos los lixiviados de la pila de estiércol bajo las jaulas de animales, el goteo y fugas del sistema de bebederos y las aguas pluviales. Cabría esperar una alta recuperación de ADN del AMDV para esta categoría, dado además que la mayoría de las muestras se tomaron en verano, durante periodos de escasa o nula pluviometría; sin embargo, sorprendentemente, encontramos la media más baja de copias de AMDV independientemente del método de extracción de ADN. Esto podría estar relacionado con la dilución viral en el agua, y quizá el método de muestreo aplicado en este caso debería ser diferente, como la toma de muestras líquidas en momentos de arrastre pluvial, o incluso incluir un protocolo de concentración previo antes del aislamiento del ADN, como se ha informado en otros estudios (Ahmed *et al.*, 2015). Sin embargo, es digno de mención que un porcentaje significativo de muestras de esta categoría fueron positivas para AMDV, aunque en un porcentaje llamativamente inferior al de las otras categorías. Con respecto a la categoría "Periferia", nuestros resultados revelan la existencia de contaminación por AMDV a cargas medias o bajas; sin embargo, la demostración de contaminación viral en estos elementos o áreas, incluso a niveles bajos, es un hecho reseñable ya que pueden estar involucrados en la propagación del virus desde una granja infectada, es decir, a través de vectores indirectos como por ejemplo el camión de reparto de pienso, como se ha descrito en otros trabajos (Espregueira Themudo *et al.*, 2011).

Por esta razón, es importante incluir los elementos de esta categoría en los protocolos de limpieza y desinfección y, más específicamente, en los planes de bioseguridad.

Con respecto a los dos protocolos de extracción de ADN empleados en este estudio, debe señalarse el acuerdo imperfecto entre ambos métodos para clasificar las muestras estudiadas como positivas/negativas. Las muestras ambientales como las empleadas en este estudio proceden de diferentes elementos/áreas, siendo de muy diversa naturaleza; por ello, las discrepancias observadas en la clasificación pueden estar relacionadas con la mayor o menor adecuación de los diferentes procedimientos de lisis y purificación de cada método. El protocolo A es un kit específico para muestras de suelo que emplea lisis química y mecánica y la posterior eliminación de inhibidores mediante floculación química y precipitación. Este método se centra principalmente en la eliminación de ácidos húmicos, un potente inhibidor del rendimiento de la PCR que se encuentra con frecuencia en la biomasa muerta y muestras de suelo (Ijzerman *et al.*, 1997). En contraste, el protocolo B es un kit de extracción de ADN más general, adecuado para una amplia variedad de muestras. Aunque el protocolo B identificó más muestras positivas que el protocolo A, no pudo detectar cuatro muestras que fueron positivas por el otro método. Estas cuatro muestras provienen de las botas de un visitante, una huella de ruedas del camión del pienso y dos efluentes, siendo todas ellas muestras asociadas al suelo. Esto muestra la necesidad de combinar ambos métodos de extracción en estudios de este tipo, incluyendo siempre uno específico para suelos como el método A. Con respecto a la cantidad de ADN viral recuperado, se observó un valor medio significativamente mayor para el protocolo B, lo que indica una mejor recuperación del ADN viral. Esto podría explicar la detección de 18 muestras que fueron positivas sólo con el protocolo B, ya que todas ellas presentaron cargas virales bajas o muy bajas (datos no mostrados); este mismo hallazgo podría estar relacionado no sólo con la eficiencia intrínseca de cada método sino también con el hecho de que durante el proceso de eliminación de inhibidores que se realiza en el protocolo A, una parte del volumen inicial no puede aprovecharse para la elución final, lo que eventualmente podría reducir la cantidad de ADN recuperado. Todas estas observaciones sugieren que el mejor esquema de análisis sería el uso combinado de ambos métodos de extracción de ADN, permitiendo así la mejor clasificación y cuantificación posible. Como alternativa, también puede ser útil emplear primero un método general de extracción de ADN como el protocolo B sobre el conjunto completo de muestras, y un procedimiento más específico como el protocolo A para volver a analizar muestras negativas de la primera ronda.

Como conclusiones generales, este estudio proporciona conocimiento inédito y de gran utilidad sobre la distribución del AMDV en diferentes elementos y zonas de granjas infectadas (caracterización del reservorio ambiental bajo unas determinadas condiciones epidemiológicas), enriqueciendo así los conocimientos sobre su epidemiología y aportando datos objetivos en apoyo o revisión de lo que hasta ahora han sido paradigmas asumidos en base a la interpretación de datos epidemiológicos y estudios basados en la infección experimental de animales susceptibles. Los presentes resultados son muy relevantes con respecto a la planificación e implementación de medidas de bioseguridad, ya que algunas de

las categorías estudiadas representan elementos móviles que pueden actuar como vectores de arrastre directo o indirecto a diferentes áreas dentro de una granja, así como a otras granjas, vehículos, dependencias o instalaciones externas. Además, nuestros resultados también tienen implicaciones importantes sobre la limpieza y desinfección de elementos y dependencias que no están nunca en contacto directo con los animales. Finalmente, el uso de pruebas ambientales para estudiar los patrones de contaminación de AMDV presenta desafíos técnicos con respecto a la recuperación de ADN viral de este tipo de muestras, que debe tenerse en cuenta antes de establecer un esquema de análisis.

El presente capítulo de esta tesis (4.2) reproduce contenidos de la siguiente publicación:

Prieto, A., **Fernández-Antonio, R.**, Díaz-Cao, J.M., López, G., Díaz, P., Alonso, J.M., Morondo, P., Fernández, G., 2017. Distribution of Aleutian mink disease virus contamination in the environment of infected mink farms. *Vet. Microbiol.* 204, 59-63.

Editorial: Elsevier (ISSN: 0378-1135).



### 4.3. ESTUDIO 3: EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE LOS EQUIPOS DE PROTECCIÓN INDIVIDUAL (EPI) CON EL AMDV

Las ecuaciones de las curvas estándar obtenidas para la qPCR fueron  $y = 36,877 - 3,453x$  e  $y = 37,789 - 3,422x$  para los ensayos de 2015 y 2017 respectivamente, siendo muy bueno en ambos casos el ajuste de la curva (2015:  $R^2=0,999$  y eficiencia = 94,82%; 2017:  $R^2=0,999$  y eficiencia = 95,99%).

Todas las muestras tomadas antes de la visita fueron negativas (2015:  $n=2$ ; 2017:  $n=15$ ). Después de la visita, se detectó contaminación en un total de 9/10 muestras (90%) en 2015 y 25/36 muestras (69,4%) en 2017. En general, las protecciones más externas del cuerpo y calzado se contaminaron en todos los casos y su nivel de contaminación fue acorde con la contaminación ambiental detectada en cada año; el grado de contaminación de los elementos cubiertos por aquellas fue variable y acorde con la contaminación de la capa de protección externa (Tablas 26 y 27). En el ensayo preliminar de 2015, la muestra de ropa de calle cubierta por el buzo-C resultó negativa, pero se detectó contaminación en 2/2 buzos-C del grupo no certificado, pese a ir cubiertos por un buzo-S; cabe mencionar que no se observaron roturas en ninguno de los buzos utilizados. Como protección del calzado, ese año sólo se testó una combinación de calzas exteriores/patucos interiores no certificados de polipropileno, detectándose contaminación tanto en las protecciones externas como en las internas, así como en el calzado. La muestra de cabello del visitante que no usó capucha también resultó positiva. En el segundo ensayo de 2017, el grupo de EPI certificados, 1/3 de las muestras de ropa de calle dieron positivo, pero en el grupo de EPI no certificados se detectó contaminación en 2/3 Buzos-C internos a pesar del hecho de que iban cubierto por un buzo-S. Al igual que en 2015, no se observaron signos de ruptura en ninguno de los buzos. En el grupo de EPI certificados se detectó contaminación en 1/3 de los patucos internos, pero no en el calzado de calle; en contraste, en el grupo de EPI no certificados se detectó contaminación en 3/3 patucos internos y en 3/3 muestras del calzado de calle. Todas las calzas-S del grupo de EPI no certificados y 1/3 de las calzas-C del grupo de EPI certificado presentaron cortes o perforaciones. La calza-C rota/perforada en el grupo certificado coincide con los patucos interiores contaminados. Las muestras de cabello de los visitantes del grupo certificado (que usaron capucha) fueron negativas, pero el 100% de las muestras de cabello de los visitantes del grupo de EPI no certificados (sin la capucha) fueron positivas.

Las muestras tomadas en las superficies de la granja para confirmar la contaminación ambiental (jaulas y suelo de las naves) resultaron positivas en todos los casos, si bien fue superior en la granja muestreada en 2015. Dado que ambas granjas se infectaron el mismo año con la misma cepa y se produjo una evolución similar en la prevalencia, compartiendo además una misma genética en los visones, esta diferencia podría deberse a un descenso de la carga ambiental ligado a la estabilización de la infección en ambas granjas a medida que se selecciona una cabaña con mayor resistencia/tolerancia al AMDV, unido además a las labores anuales de limpieza y desinfección. Mientras que en la granja 610 en 2015 se detectó contaminación en la zona de parking en la que se muestrearon los EPI al final de la visita, en la granja 661 en 2017 no se detectó contaminación en dicha zona.

Tabla 26. Resumen de los resultados de las muestras recogidas en los ensayos de 2015 y 2017 para los grupos de EPI certificados y no certificados, mostrando nº de positivos sobre el total de muestras, media y rango del nº de equivalentes genómicos/hisopo según tipo de muestra.

	AÑO 2015			AÑO 2017		
Grupo EPI certificados						
Elemento	Nº de positivos /total	Media de EG/hisopo (error estándar)	Rango	Nº de positivos /total	Media de EG/hisopo (error estándar)	Rango
Buzo certificado	1/1	4,9x10 <sup>5</sup>		3/3	3,3x10 <sup>3</sup> (2,3x10 <sup>3</sup> )	2,9x10 <sup>2</sup> - 7,8x10 <sup>3</sup>
Ropa de calle	0/1			1/3	1,0x10 <sup>2</sup>	
Calzas certificadas				3/3	5,8x10 <sup>3</sup> (2,1x10 <sup>3</sup> )	3,5x10 <sup>3</sup> - 9,9x10 <sup>3</sup>
Patucos				1/3	1,4x10 <sup>2</sup>	
Calzado de calle				0/3		
Pelo				0/3		
Grupo EPI no certificados						
Elemento	Nº de positivos /total	Media de EG/hisopo (error estándar)	Rango	Nº de positivos /total	Media de EG/hisopo (error estándar)	Rango
Buzo simple	2/2	4,2x10 <sup>5</sup> (3,7x10 <sup>5</sup> )	8,5x10 <sup>4</sup> - 7,5x10 <sup>5</sup>	3/3	4,5x10 <sup>2</sup> (1,4x10 <sup>2</sup> )	2,2x10 <sup>2</sup> - 6,9x10 <sup>2</sup>
Buzo certificado	2/2	3,3x10 <sup>4</sup> (3,0x10 <sup>4</sup> )	2,2x10 <sup>3</sup> - 6,3x10 <sup>4</sup>	2/3	1,7x10 <sup>1</sup> (3,0x10 <sup>0</sup> )	1,4x10 <sup>1</sup> - 1,9x10 <sup>1</sup>
Calzas simples	1/1	1,4x10 <sup>5</sup>		3/3	2,0x10 <sup>3</sup> (3,5x10 <sup>2</sup> )	1,4x10 <sup>3</sup> - 2,6x10 <sup>3</sup>
Patucos	1/1	3,6x10 <sup>5</sup>		3/3	2,6x10 <sup>4</sup> (1,0x10 <sup>4</sup> )	1,1x10 <sup>4</sup> - 4,5x10 <sup>4</sup>
Calzado de calle	1/1	1,8x10 <sup>5</sup>		3/3	7,2x10 <sup>1</sup> (6,0x10 <sup>1</sup> )	1,0x10 <sup>1</sup> - 9,2x10 <sup>1</sup>
Pelo	1/1	2,6x10 <sup>5</sup>		3/3	2,1x10 <sup>2</sup> (1,6x10 <sup>2</sup> )	2,7x10 <sup>1</sup> - 5,5x10 <sup>2</sup>

**Tabla 27. Resumen de los resultados de las muestras recogidas de jaulas, suelos y zona de parking en los ensayos de 2015 y 2017, mostrando nº de positivos sobre el total de muestras, media y rango del nº de equivalentes genómicos/hisopo según tipo de muestra.**

Elemento	AÑO 2015			AÑO 2017		
	Nº de positivos /total	Media de EG/hisopo (error estándar)	Rango	Nº de positivos /total	Media de EG/hisopo (error estándar)	Rango
<b>Jaulas</b>	1/1	4,0x10 <sup>6</sup>		3/3	2,1x10 <sup>5</sup> (1,2x10 <sup>5</sup> )	3,1x10 <sup>3</sup> - 5,3x10 <sup>5</sup>
<b>Suelos de naves</b>	3/3	2,2x10 <sup>6</sup> (4,4x10 <sup>5</sup> )	1,4x10 <sup>6</sup> - 2,8x10 <sup>6</sup>	3/3	1,6x10 <sup>4</sup> (8,2x10 <sup>3</sup> )	7,3x10 <sup>2</sup> - 3,2x10 <sup>4</sup>
<b>Zona parking</b>	1/1	1,2x10 <sup>5</sup>		0/1		

El conocimiento del papel del personal en la transmisión indirecta de virus puede ser importante para comprender la dinámica de las infecciones virales. Por ejemplo, se ha demostrado que la monitorización de las superficies es esencial para comprender la diseminación de los virus en hospitales o guarderías, ayudando así a establecer medidas preventivas (Boone y Gerba, 2005; Ganime *et al.*, 2015). Para determinar la dinámica de la transmisión de los virus a través de los EPI contaminados y los riesgos que ello entraña para la salud, deben cuantificarse los niveles de contaminación viral en estos elementos (Casanova *et al.*, 2009). Aunque se ha reconocido este riesgo, la magnitud del mismo es difícil de evaluar porque hay pocos datos disponibles sobre los niveles de contaminación viral en el EPI después de su uso en granjas. Esto requiere métodos efectivos y reproducibles para recuperar virus infecciosos de los distintos elementos del EPI (Casanova *et al.*, 2009). La qPCR puede ayudar en este propósito, pero la presencia de ADN viral no debe interpretarse directamente como agente infeccioso viable, ya que su detección no determina la infectividad. A pesar de eso, el conocimiento de la contaminación por virus es un paso importante para vincular los fómites con el riesgo de infección, y especialmente relevante en infecciones producidas por agentes con alta resistencia ambiental como es el caso de los parvovirus, entre los que se incluye el AMDV (Hahn *et al.*, 1977). En consecuencia, la detección de ADN del AMDV en el entorno de granjas infectadas debe considerarse como un riesgo real debido a la alta probabilidad de que los viriones mantengan su viabilidad.

Hasta donde sabemos, ésta es la primera investigación que usa qPCR para evaluar la protección de diferentes EPI frente al AMDV en condiciones de campo. La cuantificación del ADN viral en los EPI fue consistente con el nivel de contaminación superficial detectado en las granjas estudiadas, y especialmente expresiva dado que refleja el diferente nivel de contaminación ambiental de cada año (tablas 26 y 27), sugiriendo una exposición al virus durante las visitas proporcional a la carga ambiental aún en ausencia de contacto directo con los animales. La carga viral detectada en buzos y calzas externas fue moderada/alta en 2015 y baja 2017, siendo en ambos casos menor que en las muestras de suelo, lo que sugiere un efecto de arrastre de la contaminación sin concentración de la misma. En conjunto, los resultados obtenidos hacen visible que la mera presencia en un ambiente contaminado es



suficiente para detectar la contaminación en la ropa y por lo tanto constituye un riesgo potencial de transmisión de ciertos virus con alta resistencia ambiental como el AMDV.

Con respecto a los buzos, los visitantes en el grupo de EPI no certificados presentaron contaminación de elementos internos a pesar de que estaban cubiertos por elementos externos no certificados. Por lo tanto, los EPI no certificados parecen no ser suficientes para preservar a los visitantes de la contaminación viral de la ropa de calle durante las visitas a las granjas; esto es especialmente visible en el estudio del año 2015, seguramente debido a que la carga ambiental de esa granja en ese año era mucho mayor, y por lo tanto los EPI estuvieron sometidos a una mayor contaminación del ambiente. Sin embargo, en 2017, y quizá relacionado con unas cargas víricas 100 veces inferiores, sólo se detectó contaminación en 2 de los 3 buzos internos, presentando en ambos casos unas cargas víricas extremadamente bajas. Además, en 2017 una muestra de ropa de calle resultó positiva en el grupo certificado a pesar de que se usó un buzo-C externo; debido a que las muestras de ropa de calle antes de la visita resultaron negativas, se usaron buzos certificados en este grupo y además no hubo rotura de los mismos, la presencia de ADN viral en la ropa de calle en este único caso, probablemente se deba a una contaminación accidental durante la retirada del EPI, suposición que viene avalada por los resultados de 2015 obtenidos en condiciones de carga ambiental mucho más elevada. Se ha informado que la contaminación de la piel y la ropa es frecuente durante el proceso de retirada del EPI en los hospitales (Tomas *et al.*, 2015); teniendo en cuenta la baja carga viral detectada en la ropa de calle, es probable que ésta sea la causa de la contaminación detectada en esa muestra. En condiciones de campo, generalmente no se consideran protocolos estandarizados para la retirada de los EPI; por esta razón, en este estudio no se instruyó a los visitantes para que siguieran ningún protocolo especial, emulando de este modo las situaciones más frecuentes en condiciones de campo. Según nuestros resultados, es esperable que se produzca contaminación de la ropa de calle en el momento de retirada de los EPI tras las visitas a granjas infectadas, por lo que se debe considerar la implementación de protocolos para la retirada y eliminación de estos equipos de manera similar a los descritos por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades o las pautas ya recomendadas en los hospitales (Tomas *et al.*, 2015; CDC, 2019). Además, las intervenciones formativas para concienciar a los granjeros y veterinarios sobre este riesgo serían valiosas para lograr un nivel más alto de bioseguridad.

En relación con la protección del calzado, todas las muestras de patucos y calzado de calle en el grupo de EPI no certificado estaban contaminadas en ambos ensayos (2015 y 2017); en contraste, sólo los patucos de un visitante del grupo de EPI certificado se contaminaron en el ensayo de 2017, lo que sugiere una menor efectividad de las calzas protectoras S respecto a las C. Después de las visitas, en ambos ensayos todas las calzas S estaban rotas o perforadas, por lo que ésta es probablemente la fuente de contaminación de los patucos internos. Estos materiales están diseñados principalmente para ser utilizados en superficies lisas; dado que este tipo de superficies no son comunes en las granjas de visón, pueden producirse perforaciones y roturas como se observó en este estudio. Además, en el grupo de EPI no certificado, se detectó en ambos ensayos una media mayor de copias por

muestra en los patucos que en las calzas S correspondientes (alrededor de una unidad log) a pesar de que los patucos se usaron debajo de las calzas S, alcanzando mayores concentraciones que las detectadas en los pasillos de las naves de los animales y acorde con la contaminación ambiental detectada en cada año. Esto podría deberse a la entrada de partículas víricas a través de los agujeros en las calzas y su acumulación en el espacio entre ambas protecciones. En consecuencia, las calzas protectoras S rotas no protegieron de la contaminación, teniendo además un efecto acumulativo de partículas virales entre ellas y la siguiente capa de calzado. De manera similar, la muestra positiva de patucos en el grupo de EPI certificado fue detectada en el único visitante que llevaba una calza-C rota/perforada. Por lo tanto, considerando el riesgo de ruptura de estos materiales, que comprometen claramente su papel protector, valdría la pena considerar como alternativa el uso de botas de goma u otros materiales con resistencia a las superficies abrasivas y que pueden descontaminarse fácilmente para su reutilización. En relación con el empleo de las capuchas de los buzos C (grupo de EPI certificado), el empleo adecuado de éstas evitó la contaminación del cabello, en contraste con lo observado en los visitantes que no usaron capucha. Estos resultados indican que es posible la contaminación de partes del cuerpo no cubiertas y sugieren la necesidad de usar este elemento de los EPI y/o el establecer algunas rutinas como ducharse después de una visita o tiempos de inactividad obligatorios para evitar la transmisión de virus (Casal *et al.*, 2007; Simon-Grifé *et al.*, 2013).

En el caso de un virus con alta resistencia ambiental como el AMDV, que puede permanecer viable en el ambiente durante prolongados periodos de tiempo (Canuti *et al.*, 2016), resulta especialmente importante evitar la transferencia de contaminación desde la granja y otros puntos de contaminación (como los centros de peletización) a elementos móviles que se relacionan con varias granjas; uno de los elementos más significativos en este caso sería la contaminación del vehículo a partir de la ropa, pelo y calzado de visitantes que no van apropiadamente protegidos. La ropa, calzado y pelo de los visitantes de granja (veterinarios, clasificadores enviados por las casas de subasta, operarios de empresas de limpieza, desinfección, desinsectación y desratización...) así como sus vehículos (coches, camiones de reparto de pienso) son, como se demuestra en esta tesis, potenciales transmisores indirectos de la infección y, en el caso de por ejemplo los vehículos, pueden llegar a convertirse en reservorios donde el virus puede permanecer viable durante largos periodos de tiempo. Por todo ello, es importante conocer y cuantificar el riesgo de contaminación para seguidamente aplicar protocolos que lo minimicen. Evitar el “arrastre” de virus desde los focos primarios (generalmente conocidos de antemano) a elementos difíciles de desinfectar, como puede ser el calzado, dispositivos electrónicos (teléfonos móviles, por ejemplo), libretas o vehículos, requiere de protocolos claros, prácticos y bien fundamentados. Con todo, como demuestra la contaminación de la ropa de calle —presuntamente contaminada durante la retirada de los buzos certificados— o del calzado, es necesario establecer una doble barrera:

1. Al visitar los focos de contaminación, es preciso asumir que nos contaminaremos y, en consonancia, adoptar las siguientes medidas:

- a. Vestir los EPI adecuados (certificados), con preferencia de botas sobre calzas/patucos.
  - b. Evitar durante la visita el uso de dispositivos electrónicos, como móviles o cámaras fotográficas.
  - c. Los formularios de granja deben ser fotografiados por el granjero y reenviados al visitante por medios electrónicos.
  - d. Seguir un protocolo de retirada del EPI y desinfección del calzado antes de la reentrada en el vehículo.
2. Al reentrar en las granjas, debemos asumir que podemos ser portadores de contaminación residual proveniente de visitas previas a focos infectados y tomar en consonancia las siguientes medidas:
- a. La reentrada en granja debe programarse de forma que tras la visita a un foco contaminado no se visiten granjas negativas en el mismo día.
  - b. Deben lavarse cuidadosamente las manos antes de entrar en la granja.
  - c. No debe abrirse el buzo durante la visita o, en su caso, volver a lavarse las manos después de haberlo cerrado de nuevo.
  - d. No utilizar en granja dispositivos electrónicos como teléfonos o cámaras fotográficas.

Debe tenerse en cuenta que, si el AMDV puede atravesar un buzo no certificado y por tanto contaminar la capa de ropa que hay debajo, la transferencia en dirección inversa es seguramente posible. En este sentido, es importante que las granjas no infectadas utilicen igualmente EPI certificados para las visitas, puesto que no es posible determinar de antemano si éstas son portadoras o no de contaminación, pudiendo darse el caso de que dichos visitantes estén en contacto con reservorios del virus (como por ejemplo el vehículo) sin llegar a ser conscientes de ello.

Las medidas de bioseguridad constituyen uno de los pilares de la estrategia de sanidad animal de la Unión Europea en los últimos años, bajo el lema "más vale prevenir que curar" (European Commission, 2007). Un mejor control de la exposición a contaminaciones durante las visitas es un componente claro de esta estrategia, ya que numerosos patógenos pueden propagarse fácilmente de una granja a otra por esta vía. De esta manera, la eliminación segura de los EPI y su descontaminación son cruciales para evitar la diseminación de enfermedades, ya que existe el riesgo de transportar agentes infecciosos fuera de la granja. Nuestros resultados son consistentes con este hecho y refuerzan la idea de considerar que las visitas se encuentran entre los riesgos potenciales para la diseminación del AMDV. Actualmente, la bioseguridad en las granjas se logra a través de una combinación de medidas estructurales (cierre perimetral, vados de desinfección, acceso al silo de pienso desde el exterior) y operacionales (formación, protocolos de limpieza y desinfección, disponibilidad de EPI en las granjas), tanto voluntarias como legisladas a nivel nacional. El Reglamento Europeo de Sanidad Animal hace hincapié en la responsabilidad de los productores de aplicar medidas preventivas, incluida la bioseguridad en las granjas, para controlar las enfermedades contagiosas en la Unión Europea (European Commission, 2016). En concreto, el uso de EPI

para los visitantes no es obligatorio y depende de la voluntad de los granjeros, que puede ser variable. La mayoría de los granjeros están preocupados por la bioseguridad y son conscientes de su importancia para prevenir y controlar enfermedades; no obstante, las medidas de bioseguridad a veces se aplican de manera inconsistente en las granjas comerciales (Casal *et al.*, 2007) o los granjeros pueden tener una baja disposición a obligar a los visitantes al uso de EPI (Nöremark *et al.*, 2016). Además, la aplicación de estos elementos también está influenciada por su costo, en el sentido de que cuando se usan EPI se tiende a elegir elementos no certificados porque son más baratos, esperando sin mayor fundamento que ofrezcan una protección suficientemente efectiva. Nuestros resultados muestran que el EPI no certificado no confiere realmente una protección efectiva contra la contaminación de la ropa por AMDV. Además, es esperable que el uso de tales elementos de bioseguridad ineficaces pueda dar una falsa sensación de protección, aumentando así la posibilidad de transmisión de agentes infecciosos. En resumen, se necesita un mayor esfuerzo en educación sobre el riesgo y el uso racional de los EPI. Siguiendo estos principios, los resultados de esta tesis sirven para poner de manifiesto el riesgo real de contaminación por el AMDV cuando se emplean materiales y/o procedimientos inadecuados, lo que es una situación que parece pasar desapercibida. Por lo tanto, es importante que tanto los veterinarios como los granjeros sean conscientes de que se requiere el uso del EPI adecuado junto con protocolos/rutinas correctas para lograr una protección efectiva.

Un impedimento importante para la aplicación de estas medidas de control puede estar relacionado con los costos del uso de EPI y el diagnóstico molecular; sin embargo, debe tenerse en cuenta que la entrada de agentes infecciosos como el AMDV en una granja negativa puede tener un impacto desastroso en su economía. La medida de bioseguridad principal y más barata para una granja debe ser minimizar las visitas a un nivel razonablemente bajo, pero cuando las entradas en una granja son inevitables el uso de EPI certificado debe considerarse imprescindible a pesar de su costo ya que nuestros resultados demuestran que los EPI no certificados son un riesgo real de transmisión de enfermedades. En general, el costo e incomodidad de estas medidas deben contemplarse como una inversión proactiva en prevención en consonancia con las estrategias de sanidad animal promovidas por la Unión Europea (European Commission, 2007). Dado que se ha demostrado que la frecuencia de prácticas incorrectas es potencialmente alta (Nöremark *et al.*, 2016), cabe esperar que un cambio en algunas actitudes pueda tener un impacto positivo en la bioseguridad global sin significar cambios costosos. Otra opción es reservar las medidas más costosas para situaciones determinadas, como resultado del análisis de costo-beneficio y la evaluación del riesgo epidemiológico particular de una granja determinada (por ejemplo, durante brotes epizooticos en los que cabe esperar una carga ambiental mayor para un patógeno determinado). La implementación de cierto nivel de diagnóstico molecular a nivel ambiental también puede tener un valor educativo para aumentar los niveles de bioseguridad. Se ha demostrado que la escasez de ejemplos de eficiencia comprobada, combinada con la falta de formación relevante, son razones potenciales de incumplimiento de las medidas de bioseguridad (Brennan y Christley, 2012). Por lo tanto, la aplicación de qPCR a muestras ambientales y EPI puede proporcionar a los veterinarios nuevas herramientas para la

formación de los granjeros sobre la importancia de la bioseguridad, proporcionando una forma objetiva de valorar estos riesgos.

El presente capítulo de esta tesis (4.3) reproduce contenidos de la siguiente publicación:

Díaz-Cao, J.M., Prieto, A., López, G., **Fernández-Antonio, R.**, Díaz, P., López, C., Remesar, S., Díez-Baños, P., Fernández, G., 2018. Molecular assessment of visitor personal protective equipment contamination with the Aleutian mink disease virus and porcine circovirus-2 in mink and porcine farms. PLoS One 13(8), e02033144.

Editorial: Public Library Science (eISSN: 1932-6203).



#### **4.4. ESTUDIO 4: EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD ALEUTIANA DEL VISÓN DEL VISÓN EN ESPAÑA: ESTUDIO RETROSPECTIVO DEL PERIODO 2012-2020**

Todas las muestras ( $n = 43$ ) se amplificaron y secuenciaron con éxito para los genes NS1 y VP2; después de la corrección manual y la alineación, las secuencias se recortaron a la misma longitud (328 pb para NS1 y 628 pb para VP2). Las secuencias NS1 mostraron una identidad del 83,2-100% entre sí, mientras que las secuencias VP2 oscilaron entre el 91-100% de identidad (Tabla 28). En los casos en que se analizaron muestras de la misma granja pero de diferentes años (nueve granjas), las secuencias obtenidas fueron prácticamente idénticas para ambos genes independientemente del año de muestreo (99,6-100% de identidad para NS1; 99,5-100% de identidad para VP2), con tres excepciones, granjas 936, 985 y 672. La granja 936 presentó dos secuencias diferentes según el año del brote, 2015 y 2018/2019 (92,3% de identidad para NS1; 96,9% de identidad para VP2). Lo mismo ocurrió en la granja 985 para los brotes del 2015 y 2020 (88,1% de identidad para el gen NS1 y 97,9% para el VP2). En el caso de la 672 la homología para los brotes de 2019 y 2020 es del 98,7% para el NS1 y 99,6% para el VP2 (4 y 3 nucleótidos respectivamente), lo suficientemente baja en el gen NS1 como para ser considerada dentro de las excepciones. Con respecto al análisis filogenético de los tres conjuntos de datos de este estudio (NS1, VP2 y NS1 + VP2 concatenados), se encontró que el modelo GTR (General Time-Reversible) con tasa de sustitución basada en distribución gamma (GTR+G) fue el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustó. Los árboles filogenéticos construidos para las secuencias de este estudio se muestran en las figuras 23, 24 y 25 para NS1, VP2 y NS1+VP2 concatenados, respectivamente. La nomenclatura de los clados utilizados en el árbol NS1 se ha conservado en la medida de lo posible en los otros árboles para facilitar la comprensión del lector.



Tabla 28. Porcentajes de homología para todas las secuencias obtenidas en este estudio para la diana molecular de NS1 (color verde pálido, parte inferior de la tabla) y VP2 (color verde oliva, parte superior de la tabla). Las secuencias se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”.

	622.1/2014	622.3/2016	622.6/2018	633.1/2018	672.1/2019	672.2/2019	672.1/2020	672.3/2020	382.1/2014	382.2/2105	540.1/2014	542.1/2017
622.1/2014		100	100	99,8	99,6	99,6	100	100	98,4	98,2	95	94,4
622.3/2016	100		100	99,8	99,6	99,6	100	100	98,4	98,2	95	94,4
622.6/2018	100	100		99,8	99,6	99,6	100	100	98,4	98,2	95	94,4
633.1/2018	98,4	98,4	98,4		99,8	99,8	99	99	98,2	98	95,2	94,5
672.1/2019	98,1	98,1	98,1	99,6		99,6	99,6	99,6	98	97,9	95	94,4
672.2/2019	98,1	98,1	98,1	99,6	100		99,6	99,6	98	97,9	95	94,4
672.1/2020	98,7	98,7	98,7	98,4	98,7	98,7		100	98,4	98,2	95	94,4
672.3/2020	98,7	98,7	98,7	98,4	98,7	98,7	100		98,4	98,2	95	94,4
382.1/2014	97,8	97,8	97,8	98,1	98,4	98,4	98,4	98,4		99,8	94,2	93,6
382.2/2105	97,8	97,8	97,8	98,1	98,4	98,4	98,4	98,4	100		94,4	93,7
540.1/2014	84,1	84,1	84,1	84,4	84,1	84,1	84,7	84,7	85,6	85,6		99,3
542.1/2017	83,8	83,8	83,8	84,1	83,8	83,8	84,4	84,4	85,3	85,3	99	
545.1/2015	83,8	83,8	83,8	84,1	84,4	84,4	85	85	85,6	85,6	98,1	99
610.1/2013	86,2	86,2	86,2	86,2	85,9	85,9	86,2	86,2	87,1	87,1	86,2	86,5
610.2/2016	86,2	86,2	86,2	86,2	85,9	85,9	86,2	86,2	87,1	87,1	86,2	86,5
612.1/2014	86,2	86,2	86,2	86,2	85,9	85,9	86,2	86,2	87,1	87,1	86,2	86,5
612.2/2016	86,2	86,2	86,2	86,2	85,9	85,9	86,2	86,2	87,1	87,1	86,2	86,5
616.1/2016	85	85	85	85	84,7	84,7	85,3	85,3	85,3	85,3	86,2	85,9
619.1/2013	86,2	86,2	86,2	86,2	85,9	85,9	86,2	86,2	87,1	87,1	86,2	86,5
619.2/2016	86,2	86,2	86,2	86,2	85,9	85,9	86,2	86,2	87,1	87,1	86,2	86,5
661.1/2013	86,2	86,2	86,2	86,2	85,9	85,9	86,2	86,2	87,1	87,1	86,2	86,5
661.2/2013	86,2	86,2	86,2	86,2	85,9	85,9	86,2	86,2	87,1	87,1	86,2	86,5
661.3/2013	86,2	86,2	86,2	86,2	85,9	85,9	86,2	86,2	87,1	87,1	86,2	86,5
661.4/2016	86,2	86,2	86,2	86,2	85,9	85,9	86,2	86,2	87,1	87,1	86,2	86,5
6109.1/2014	86,2	86,2	86,2	86,2	85,9	85,9	86,2	86,2	87,1	87,1	86,2	86,5
936.1/2015	91,4	91,4	91,4	92,3	92	92	91,4	91,4	92,6	92,6	85,3	85
936.2/2018	89	89	89	89,9	89,6	89,6	89	89	90,2	90,2	87,5	87,1
936.1/2019	89,3	89,3	89,3	89,6	89,3	89,3	89,3	89,3	90,5	90,5	87,8	87,5
936.2/2019	89	89	89	89,9	89,6	89,6	89	89	90,2	90,2	87,5	87,1
985.1/2015	83,2	83,2	83,2	84,1	83,8	83,8	83,5	83,5	84,4	84,4	91,1	90,2
985.1/2020	88,7	88,7	88,7	89,6	89,3	89,3	88,7	88,7	89,9	89,9	87,1	86,8
985.2/2020	89	89	89	89,9	89,6	89,6	89	89	90,2	90,2	87,5	87,1
162.1/2018	91,1	91,1	91,1	92	91,7	91,7	91,4	91,4	92,3	92,3	85	84,7
1130.1/2018	91,1	91,1	91,1	92	91,7	91,7	91,4	91,4	92,3	92,3	85	84,7

Tabla 28. Continuación.

	545.1/2015	610.1/2013	610.2/2016	612.1/2014	612.2/2016	616.1/2016	619.1/2013	619.2/2016	661.1/2013	661.2/2013	661.3/2013
622.1/2014	94,1	96	95,7	95,8	95,8	95,8	95,8	95,8	95,7	95,7	95,5
622.3/2016	94,1	96	95,7	95,8	95,8	95,8	95,8	95,8	95,7	95,7	95,5
622.6/2018	94,1	96	95,7	95,8	95,8	95,8	95,8	95,8	95,7	95,7	95,5
633.1/2018	94,2	95,8	95,5	95,7	95,7	96	95,7	95,7	95,5	95,5	95,3
672.1/2019	94,1	95,7	95,3	95,5	95,5	95,8	95,5	95,5	95,3	95,3	95,2
672.2/2019	94,4	95,7	95,3	95,5	95,5	95,8	95,5	95,5	95,3	95,3	95,2
672.1/2020	94,1	96	95,7	95,8	95,8	95,8	95,8	95,8	95,7	95,7	95,5
672.3/2020	94,1	96	95,7	95,8	95,8	95,8	95,8	95,8	95,7	95,7	95,5
382.1/2014	93,3	95	95	94,9	94,9	94,9	94,9	94,9	94,7	95	94,9
382.2/2105	93,4	95,2	95,2	95	95	94,7	95	95	94,9	95,2	95
540.1/2014	99	96,4	96,3	96,3	96,3	96,1	96,3	96,3	96,1	96,3	96,1
542.1/2017	99,6	96,4	96,3	96,3	96,3	96,1	96,3	96,3	96,1	96,3	96,1
545.1/2015		96,1	96	96	96	95,8	96	96	95,8	96	95,8
610.1/2013	85,6		99,6	99,8	99,8	98,2	99,8	99,8	99,6	99,6	99,5
610.2/2016	85,6	100		99,8	99,8	97,9	99,8	99,8	99,6	100	99,8
612.1/2014	85,6	100	100		100	98	100	100	99,8	99,8	99,6
612.2/2016	85,6	100	100	100		98	100	100	99,8	99,8	99,6
616.1/2016	85,3	95,1	95,1	95,1	95,1		98	98	97,9	97,9	97,7
619.1/2013	85,6	100	100	100	100	95,1		100	99,8	99,8	99,6
619.2/2016	85,6	100	100	100	100	95,1	100		99,8	99,8	99,6
661.1/2013	85,6	100	100	100	100	95,1	100	100		99,6	99,5
661.2/2013	85,6	100	100	100	100	95,1	100	100	100		99,8
661.3/2013	85,6	100	100	100	100	95,1	100	100	100	100	
661.4/2016	85,6	100	100	100	100	95,1	100	100	100	100	100
6109.1/2014	85,6	100	100	100	100	95,1	100	100	100	100	100
936.1/2015	85,3	86,8	86,8	86,8	86,8	85,6	86,8	86,8	86,8	86,8	86,8
936.2/2018	86,8	87,1	87,1	87,1	87,1	86,8	87,1	87,1	87,1	87,1	87,1
936.1/2019	87,1	87,5	87,5	87,5	87,5	87,1	87,5	87,5	87,5	87,5	87,5
936.2/2019	86,8	87,1	87,1	87,1	87,1	86,8	87,1	87,1	87,1	87,1	87,1
985.1/2015	89,9	86,8	86,8	86,8	86,8	86,2	86,8	86,8	86,8	86,8	86,8
985.1/2020	86,5	86,8	86,8	86,8	86,8	86,5	86,8	86,8	86,8	86,8	86,8
985.2/2020	86,8	87,1	87,1	87,1	87,1	86,8	87,1	87,1	87,1	87,1	87,1
162.1/2018	85	85,9	85,9	85,9	85,9	86,2	85,9	85,9	85,9	85,9	85,9
1130.1/2018	85	85,9	85,9	85,9	85,9	86,2	85,9	85,9	85,9	85,9	85,9

Tabla 28. Continuación.

	661.4/2016	6109.1/2014	936.1/2015	936.2/2018	936.1/2019	936.2/2019	985.1/2015	985.1/2020	985.2/2020	162.1/2018	1130.1/2018
622.1/2014	95,7	95,8	92	92,3	92,5	92,5	91	92,5	92,5	92,1	92,1
622.3/2016	95,7	95,8	92	92,3	92,5	92,5	91	92,5	92,5	92,1	92,1
622.6/2018	95,7	95,8	92	92,3	92,5	92,5	91	92,5	92,5	92,1	92,1
633.1/2018	95,5	95,7	92,1	92,5	92,6	92,6	91,2	92,6	92,6	92,3	92,3
672.1/2019	95,3	95,5	92	92,3	92,5	92,5	91	92,5	92,5	92,1	92,1
672.2/2019	95,3	95,5	92,1	92,3	92,5	92,5	91,2	92,5	92,5	92,3	92,3
672.1/2020	95,7	95,8	92	92,3	92,5	92,5	91	92,5	92,5	92,1	92,1
672.3/2020	95,7	95,8	92	92,3	92,5	92,5	91	92,5	92,5	92,1	92,1
382.1/2014	95	94,9	92,1	92,3	92,5	92,5	91,4	92,5	92,5	91,8	91,8
382.2/2105	95,2	95	92,3	92,5	92,6	92,6	91,5	92,6	92,6	92	92
540.1/2014	96,3	96,3	93,7	93,7	93,9	93,9	92,8	93,9	93,9	93,7	93,7
542.1/2017	96,3	96,3	93,4	93,3	93,4	93,4	92,3	93,4	93,4	93,6	93,6
545.1/2015	96	96	93,4	92,9	93,1	93,1	92,1	93,1	93,1	93,6	93,6
610.1/2013	99,6	99,8	92,3	92,9	92,9	92,9	91,7	92,9	92,9	92,8	92,8
610.2/2016	100	99,8	92,6	93,3	93,3	93,3	92	93,3	93,3	92,8	92,8
612.1/2014	99,8	100	92,5	93,1	93,1	93,1	91,8	93,1	93,1	92,9	92,9
612.2/2016	99,8	100	92,5	93,1	93,1	93,1	91,8	93,1	93,1	92,9	92,9
616.1/2016	97,9	98	91,8	92,5	92,5	92,5	91,2	92,5	92,5	92,3	92,3
619.1/2013	99,8	100	92,5	93,1	93,1	93,1	91,8	93,1	93,1	92,9	92,9
619.2/2016	99,8	100	92,5	93,1	93,1	93,1	91,8	93,1	93,1	92,9	92,9
661.1/2013	99,6	99,8	92,3	92,9	92,9	92,9	91,7	92,9	92,9	92,8	92,8
661.2/2013	100	99,8	92,6	93,3	93,3	93,3	92	93,3	93,3	92,8	92,8
661.3/2013	99,8	99,6	92,6	93,3	93,3	93,3	92	93,3	93,3	92,8	92,8
661.4/2016		99,8	92,6	93,3	93,3	93,3	92	93,3	93,3	92,8	92,8
6109.1/2014	100		92,5	93,1	93,1	93,1	91,8	93,1	93,1	92,9	92,9
936.1/2015	86,8	86,8		96,9	97,1	97,1	96,6	97,1	97,1	98,2	98,2
936.2/2018	87,1	87,1	92,6		99,5	99,8	98	99,8	99,8	97,7	97,7
936.1/2019	87,5	87,5	92,3	99,6		99,6	98,2	99,6	99,6	97,6	97,6
936.2/2019	87,1	87,1	92,6	100	99,6		97,9	100	100	97,6	97,6
985.1/2015	86,8	86,8	85,3	88,4	88,1	88,4		97,9	97,9	97,4	97,4
985.1/2020	86,8	86,8	92,3	99,6	99,3	99,6	88,1		100	97,6	97,6
985.2/2020	87,1	87,1	92,6	100	99,6	100	88,4	99,6		97,6	97,6
162.1/2018	85,9	85,9	97,8	92	91,7	92	84,4	91,7	92		100
1130.1/2018	85,9	85,9	97,8	92	91,7	92	84,4	91,7	92	100	

En base al **árbol filogenético NS1**, las secuencias del AMDV obtenidas en este estudio se dividieron en tres clados (Figura 23). El clado I está constituido por siete granjas, divididas en tres subclados con una cierta relación geográfica entre ellas: el subclado Ia comprende tres granjas en el noroeste de Galicia con una distancia máxima de 17 km entre ellas, así como las secuencias de la granja francesa (382); el subclado Ib agrupa tres granjas, una del suroeste de Galicia y las dos granjas del noroeste de Portugal, que se encuentran a una distancia máxima de 13 km entre ellas. El subclado Ic contiene secuencias de dos brotes esporádicos recientes de dos granjas en el suroeste de Galicia en los años 2018/2019 (936) y 2020 (985), que se habían infectado previamente en 2015 con cepas diferentes pertenecientes a los subclados Ib y IIb, respectivamente. El clado II es el más pequeño, sólo compuesto por cuatro granjas; tres de ellas forman el subclado IIa y están ubicadas en el centro de España, relativamente cercanas entre sí (56 km de distancia máxima), mientras que la granja restante forma el subclado IIb y está ubicada en el suroeste de Galicia (985), geográficamente más relacionada con las granjas de los subclados Ib y Ic; no obstante, a pesar de quedar todas comprendidas en la misma rama del árbol filogenético, la homología es mucho más alta entre secuencias obtenidas en las granjas del centro de España (promedio = 98,7%) que entre éstas y la granja gallega (promedio = 90,4%). El clado III comprende seis granjas, todas ellas en el noroeste de Galicia, y está dividido en el subclado IIIa, que incluye cinco granjas con exactamente la misma secuencia NS1 en todas las muestras y una distancia máxima de 2,5 km entre ellas, y el subclado IIIb, que comprende una sola granja distante aproximadamente 44 km de las granjas del subclado IIIa, más cercana geográficamente a las 3 granjas españolas del subclado Ia que a las del clado IIIa, pero históricamente relacionada con ambos subclados. La homología entre los subclados IIIa y IIIb es del 95,1%.

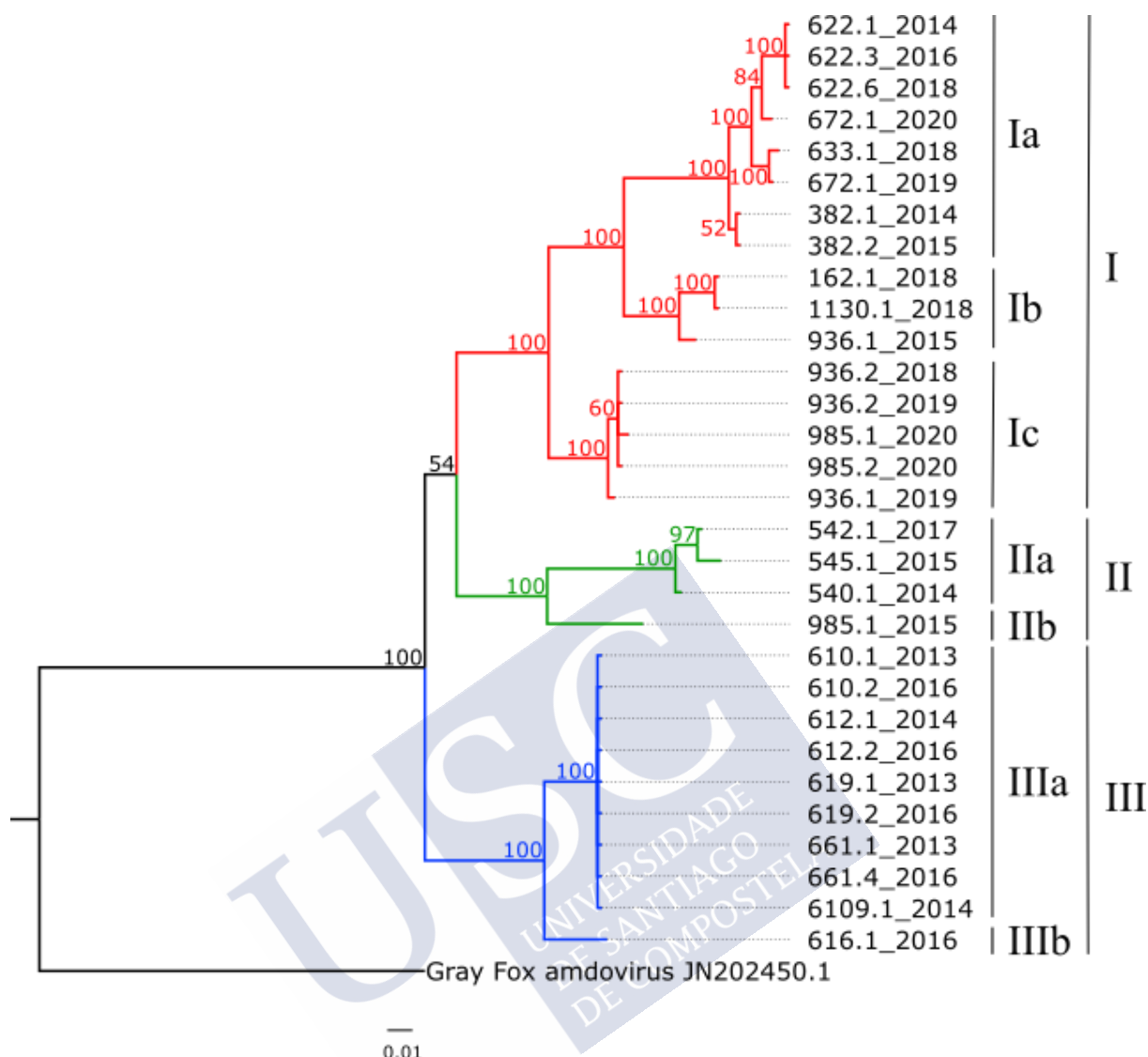


Figura 23. Árbol filogenético bayesiano construido en base al fragmento del gen NS1 de las cepas de este estudio. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Cada secuencia se denomina con el siguiente código: "Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida". Los diferentes clados se muestran con colores diferentes (Clado I = rojo; Clado II = verde; Clado III = azul. La secuencia del Gray Fox amdovirus (nº de acceso de GenBank JN202450.1) se añadió con el fin de enraizar el árbol y poder inferir posibles relaciones ancestrales. La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio.

El **árbol filogenético para el VP2** (Figura 24) fue ligeramente diferente al obtenido para el gen NS1, presentando un total de cuatro clados principales. El clado I incluye exactamente las mismas secuencias que el subclado Ia del NS1. El clado II fue el más pequeño nuevamente, pero en este caso sólo comprende las secuencias de las tres granjas en el centro del país (coincidiendo con el subclado Ila del NS1). El clado III fue idéntico al clado III del NS1, con la misma división de subclados. Finalmente, se formó un nuevo clado, clado IV, que reúne las secuencias NS1 de los subclados Ib, Ic y Iib, representando así todos los brotes de las cuatro granjas situadas en el suroeste de Galicia y el noroeste de Portugal.

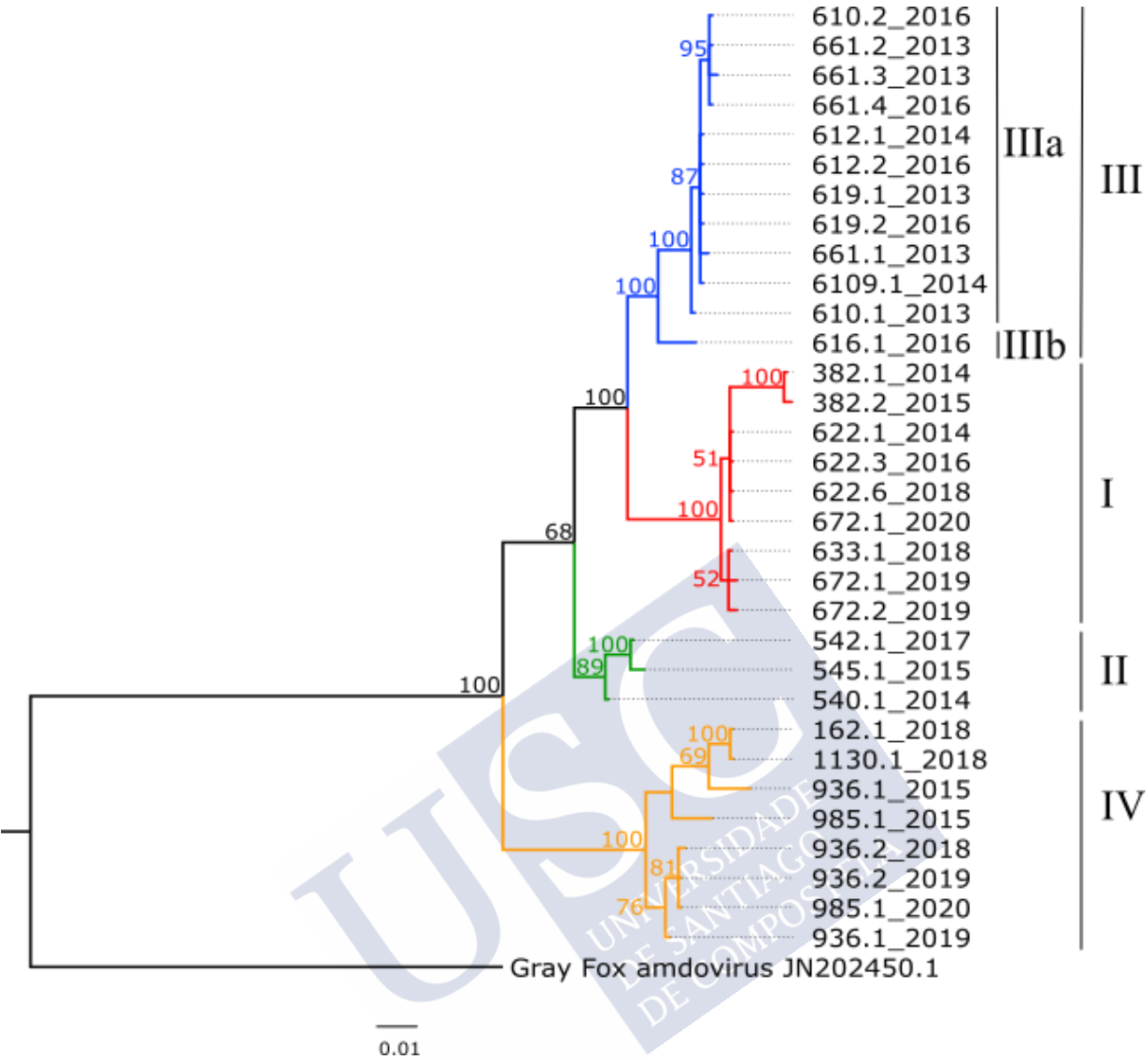


Figura 24. Árbol filogenético bayesiano construido en base al fragmento del gen VP2 de las cepas de este estudio. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Cada secuencia se denomina con el siguiente código: “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”. Los diferentes clados se muestran con colores diferentes (Clado I = rojo; Clado II = verde; Clado III = azul; Clado IV = naranja). La secuencia del Gray Fox amdovirus (nº de acceso de GenBank JN202450.1) se añadió con el fin de enraizar el árbol y poder inferir posibles relaciones ancestrales. La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio.

El **árbol concatenado NS1+VP2** también se divide en cuatro clados (Figura 25), formando grupos idénticos al árbol filogenético VP2 con algunas diferencias en la ramificación terminal. Curiosamente, la agrupación de ambos árboles presentó una alta concordancia con la distribución geográfica de las granjas. De esta manera, las secuencias de los clados III y IV sólo se detectaron en el noroeste de España (Galicia) y la frontera norte de Portugal; sin embargo, debe señalarse que hubo una clara división geográfica entre ambos clados, ya que las secuencias del clado III sólo aparecen en granjas del norte de esta región (Figura 26B), mientras que las secuencias del clado IV se detectaron exclusivamente en las granjas del suroeste de Galicia y norte de Portugal, formando un grupo geográfico (Figura 26C). Del mismo modo, las secuencias del clado II sólo se describieron en las tres granjas del



centro del país. Finalmente, las secuencias españolas del clado I también presentaron una agrupación geográfica definida, correspondiéndose con tres granjas ubicadas en un área bien delimitada, cercana a Santiago de Compostela, con un grado de homología mayor entre ellas que con las secuencias de la granja francesa de este clado (Figura 26B).

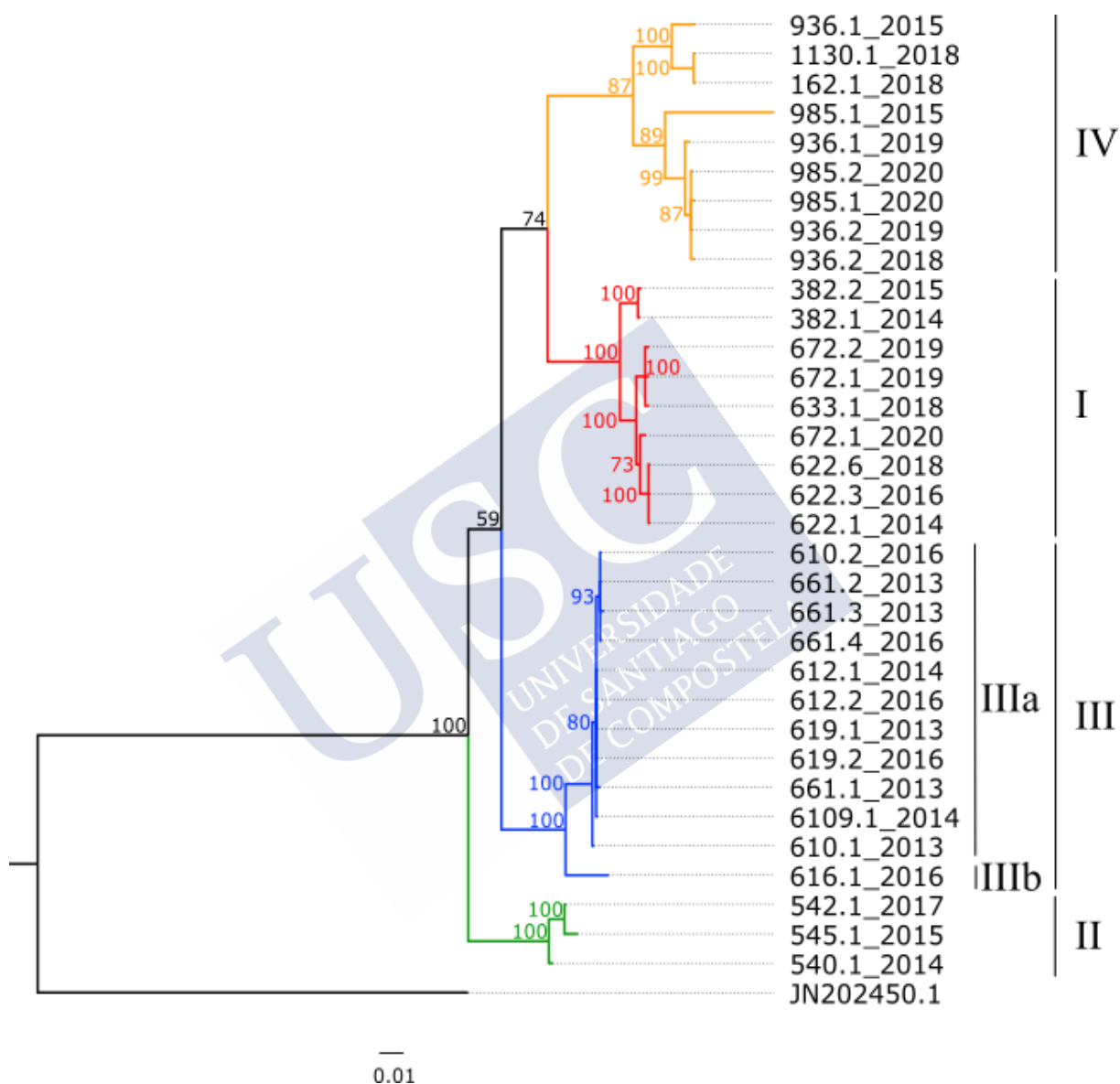


Figura 25. Árbol filogenético bayesiano construido en base al análisis concatenado de los fragmentos NS1 y VP2 de las cepas de este estudio. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Cada secuencia se denomina con el siguiente código: "N° de granja.N° de muestra\_Año de recogida". Los diferentes clados se muestran con colores diferentes (Clado I = rojo; Clado II = verde; Clado III = azul; Clado IV = naranja). La secuencia del Gray Fox amdovirus (n° de acceso de GenBank JN202450.1) se añadió con el fin de enraizar el árbol y poder inferir posibles relaciones ancestrales. La barra de escala inferior representa el promedio de n° de sustituciones por sitio.

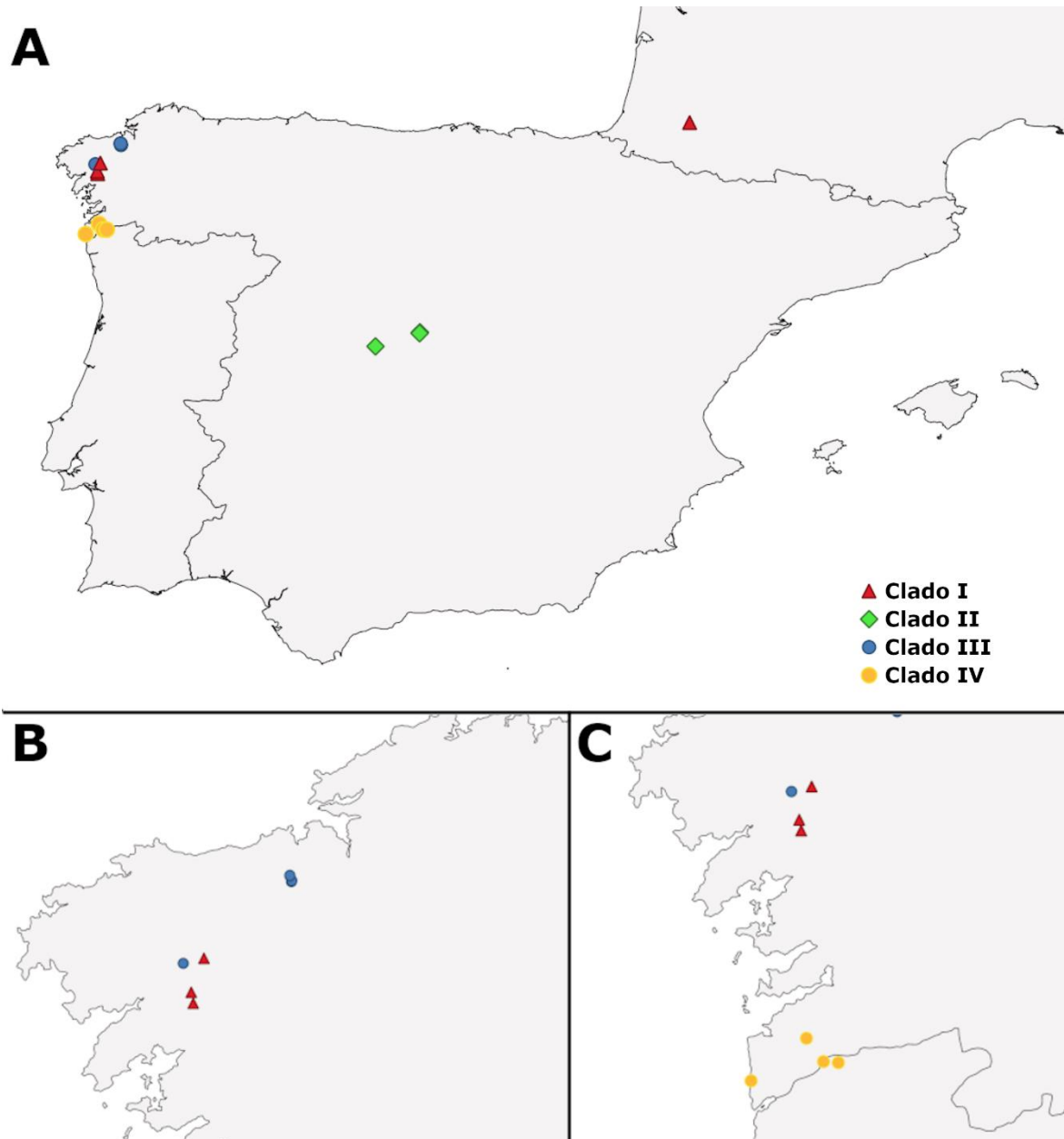
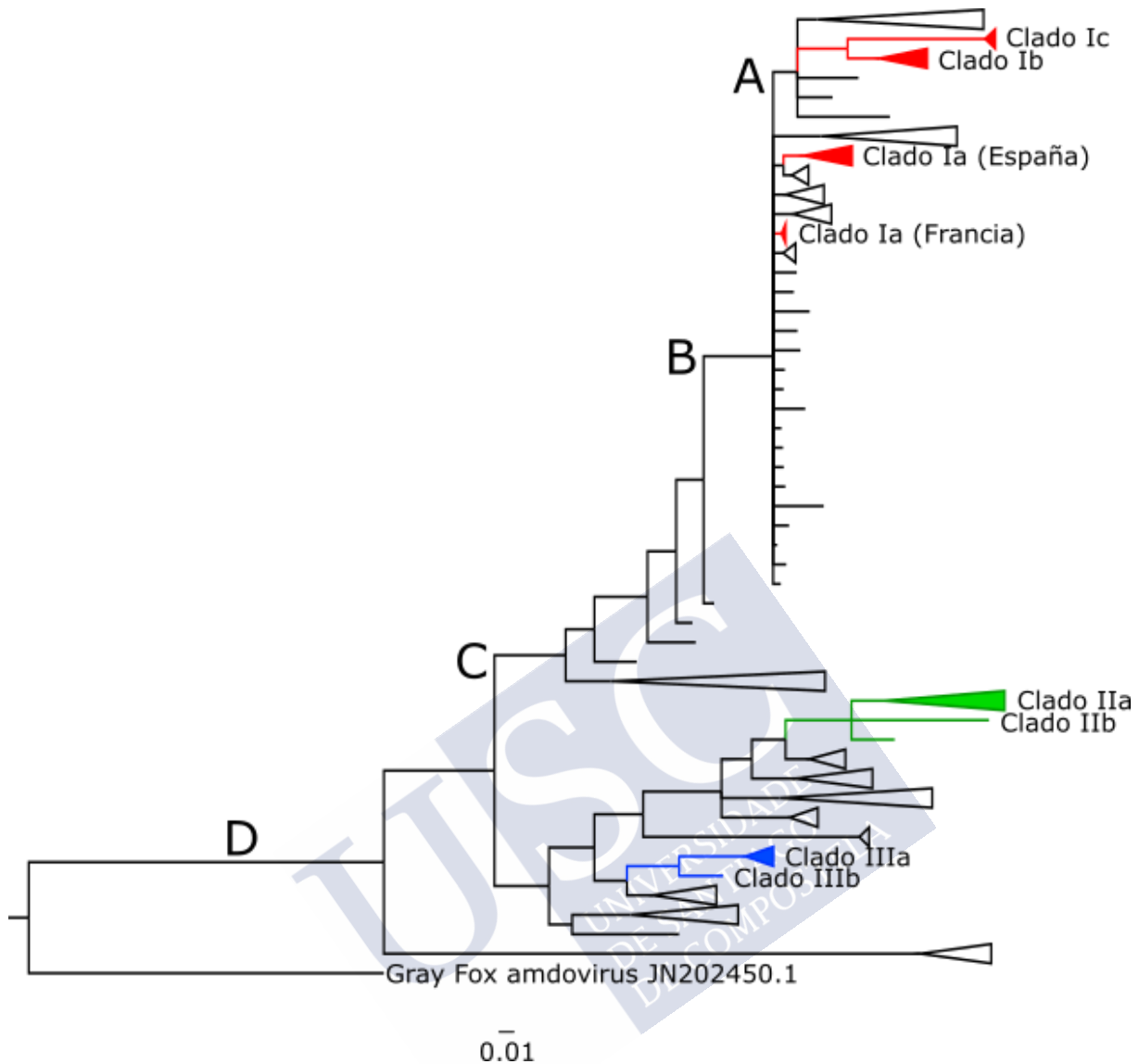


Figura 26. Distribución de las granjas de este estudio (Rojo, clado I; verde, clado II; azul, clado III; amarillo, clado IV). A) Mapa de la península Ibérica con las zonas adyacentes de Francia y Portugal; B) Zona noroeste de Galicia (zonas próximas a A Coruña y Santiago de Compostela); C) Zona sur de Galicia y norte de Portugal.

Con respecto al análisis filogenético de **los dos conjuntos de datos globales** de secuencias NS1 y VP2, el mejor modelo de sustitución en ambos casos fue el modelo GTR con tasa de sustitución basada en distribución gamma y una proporción de sitios invariables (GTR+G+I). Los dos árboles generados, debido a su gran tamaño, se muestran en ambos casos como un esquema general del árbol (Figura 27 para NS1 y Figura 32 para VP2) junto con diferentes ampliaciones en detalle de los mismos (Figuras 28, 28, 30 y 31 para NS1 y Figuras 33 y 34 para VP2).

El árbol filogenético global generado a partir del conjunto de **secuencias del gen NS1** disponibles en el GenBank (Anexo I) ilustra la distribución de los grupos de este estudio con respecto a los publicados previamente para España y otros países (Figuras 27, 28, 29, 310 y 31). Puede observarse como el clado I aparece fragmentado y disperso (Figuras 28 y 29); así, las secuencias del subclado Ia se agrupan prácticamente granja por granja, y todas ellas se agrupan con secuencias de Polonia, los Países Bajos y Grecia mostrando homologías entre un 94,8-99% (Tabla 29), mientras que las secuencias de los subclados Ib y Ic forman un subgrupo bien definido dentro de un extenso grupo con cepas de múltiples países, si bien con homologías más bajas que en el caso del clado Ia (Tabla 30). Por otro lado, las secuencias del clado II (subclados IIa y IIb, Figura 31) se agrupan principalmente con cepas descritas en Polonia, Italia, Grecia y Suecia, pero mostrando homologías bastante bajas (Tabla 31). Por último, las secuencias del clado III de este estudio se agruparon con las únicas tres secuencias españolas NS1 descritas previamente (Ryt-Hansen *et al.*, 2017a) (Figura 31); dichas cepas proceden de muestras tomadas en 2016 en tres de las granjas del subclado IIIa y son prácticamente idénticas a las de dicho subclado obtenido en este estudio (Tabla 32). Como puede observarse, las secuencias de este clado no presentan una alta relación con las cepas de otros países (Figura 31); además, dichas secuencias parecen bastante conservadas en relación con el resto de las secuencias NS1 descritas anteriormente, lo que nos lleva a suponer que pueda tratarse de una cepa antigua, presente desde el origen de la implantación de las primeras granjas en dicha zona en los años 80 y que pudo haber reemergido en el brote del 2012.



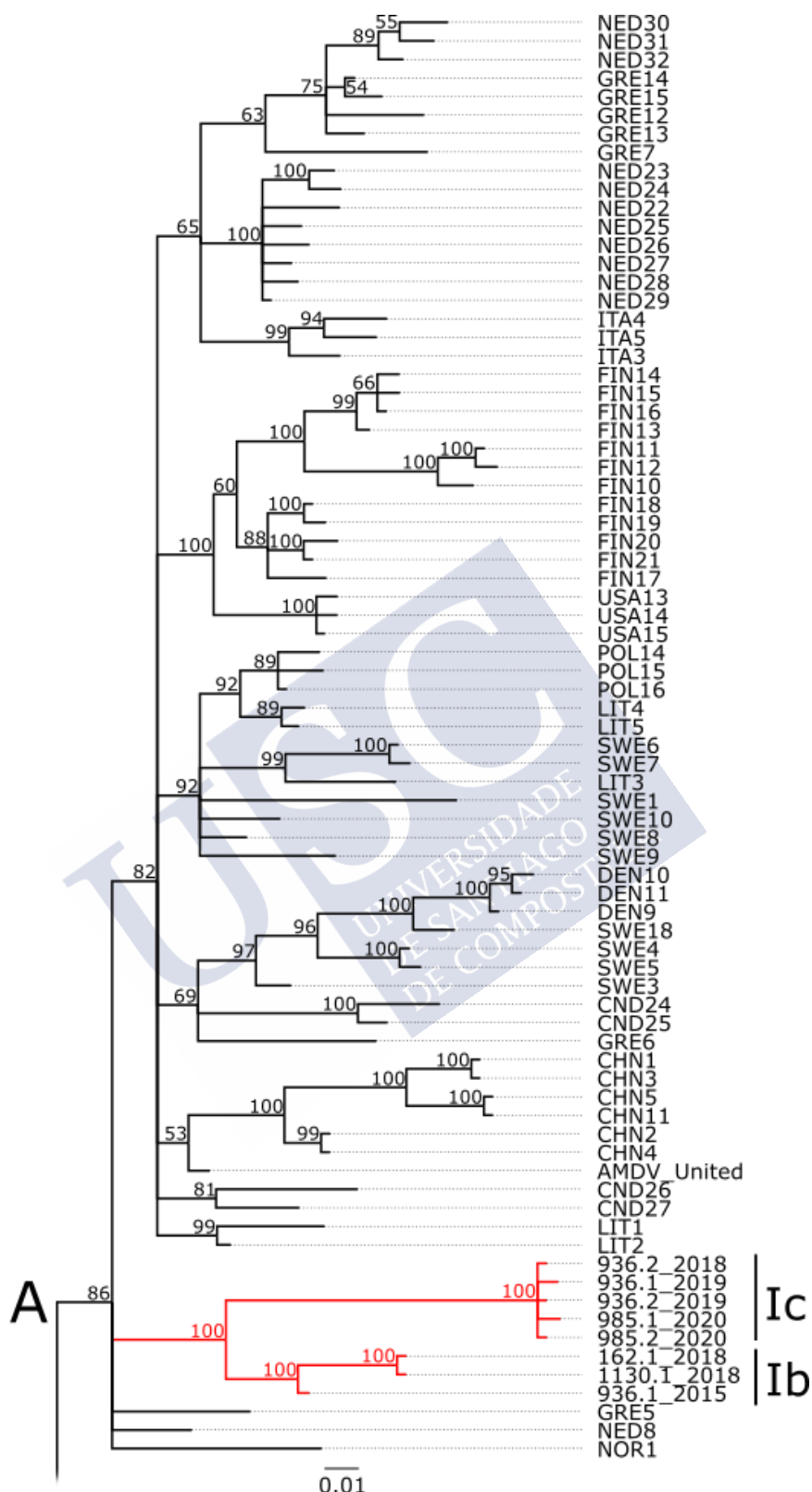


Figura 28. Fragmento del árbol filogenético bayesiano construido para la diana NS1 que representa una ampliación de la rama A identificada en la figura 27. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas obtenidas de GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo I). La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio.

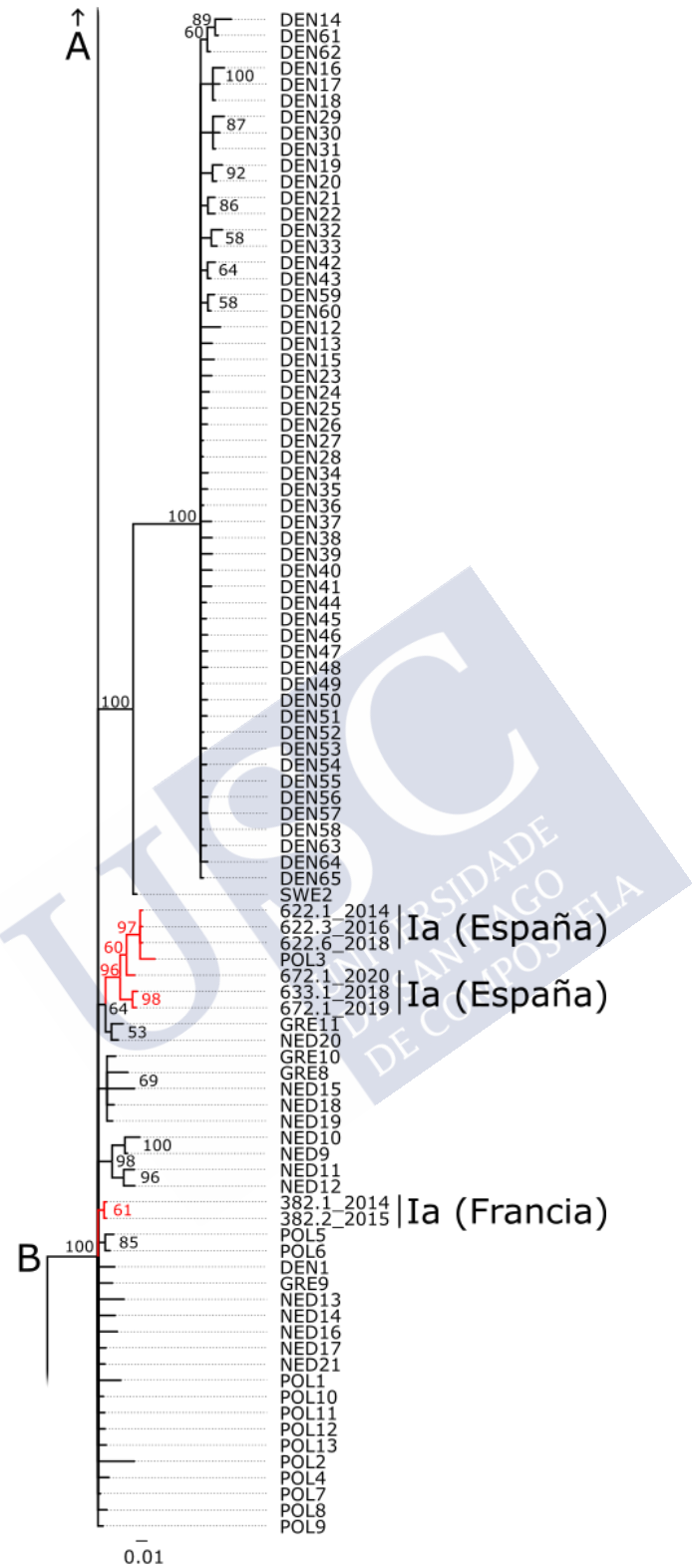


Figura 29. Fragmento del árbol filogenético bayesiano construido para la diana NS1 que representa una ampliación de la rama B identificada en la figura 27. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas obtenidas de GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo I). La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio.



**Tabla 29. Porcentajes de homología para la diana molecular NS1 entre las secuencias del subclado la de este estudio (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “N° de granja.N° de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y n° (Anexo I).**

	622.1/2014	633.1/2018	672.1/2019	672.1/2020	382.1/2014
POL3	99	97,5	97,2	97,8	98,1
NED20	98,1	98,4	98,1	98,1	99
GRE11	97,8	98,1	97,8	97,8	98,7
POL7	97,5	97,8	97,5	98,1	99
POL4	97,5	97,8	97,5	98,1	98,7
NED18	97,5	97,8	97,5	97,5	98,4
POL6	97,2	97,5	97,2	97,8	98,7
POL5	97,2	96,9	96,6	97,2	98,1
GRE10	97,2	98,1	97,8	97,2	98,7
GRE9	97,2	97,5	97,8	97,8	98,7
NED17	97,2	97,5	97,8	98,4	98,7
NED19	97,2	97,5	97,2	97,2	98,7
DEN1	97,2	96,6	96,3	96,9	97,8
POL10	96,9	97,2	96,9	97,5	98,4
POL12	96,9	97,8	97,5	97,5	98,4
POL13	96,9	97,2	96,9	97,5	98,4
POL11	96,9	97,2	96,9	97,5	98,4
POL8	96,9	97,8	97,5	97,5	98,4
NED14	96,9	96,6	96,3	96,9	97,8
NED16	96,9	97,8	97,5	96,9	98,4
NED21	96,9	97,2	97,5	98,1	99
LIT5	95,4	95,7	95,4	95,4	96
AMDV-UNITED	95,1	95,4	95,1	95,1	96,3
SWE5	94,8	95,1	95,4	95,4	96

Tabla 30. Porcentajes de homología para la diana molecular NS1 entre las secuencias de los subclados Ib y Ic de este estudio (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “N° de granja.N° de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y n° (Anexo I).

	Subclado Ib			Subclado Ic				
	936.1/2015	162.1/2018	1130.1/2018	936.2/2018	936.1/2019	936.2/2019	985.1/2020	985.2/2020
LIT4	94,2	93,2	93,2	89,9	89,6	89,9	89,6	89,9
GRE5	94,2	92	92	91,4	91,1	91,4	91,1	91,4
LIT5	94,2	93,2	93,2	89,9	90,2	89,9	89,6	89,9
AMDV-UNITED	93,9	94,2	94,2	91,1	91,4	91,1	90,8	91,1
NED8	93,9	91,7	91,7	90,2	90,5	90,2	89,9	90,2
LIT2	93,5	93,9	93,9	91,4	91,7	91,4	91,1	91,4
NED9	93,5	92,6	92,6	88,4	88,7	88,4	88,1	88,4
FIN14	93,5	93,9	93,9	89,9	90,2	89,9	89,6	89,9
FIN18	93,5	93,9	93,9	89,6	89,9	89,6	89,3	89,6
FIN21	93,5	93,9	93,9	90,2	90,5	90,2	89,9	90,2
GRE14	93,2	92,6	92,6	90,8	90,5	90,8	90,5	90,8
FIN16	93,2	93,5	93,5	89,6	89,9	89,6	89,3	89,6
FIN19	93,2	93,5	93,5	89,3	89,6	89,3	89	89,3
SWE8	93,2	93,2	93,2	89,9	90,2	89,9	89,6	89,9
GRE10	92,9	92,6	92,6	90,5	90,2	90,5	90,2	90,5
GRE9	92,9	92	92	89,9	90,2	89,9	89,6	89,9
NED18	92,9	92,6	92,6	90,5	90,2	90,5	90,2	90,5
NED19	92,9	92,6	92,6	90,5	90,8	90,5	90,2	90,5
POL7	92,9	92,9	92,9	90,5	90,8	90,5	90,2	90,2
POL12	92,9	93,5	93,5	90,8	90,5	90,8	90,5	90,8
ITA3	92,9	92,6	92,6	90,2	89,9	90,2	89,9	90,2
ITA4	92,3	92	92	89,6	89,3	89,6	89,3	89,6

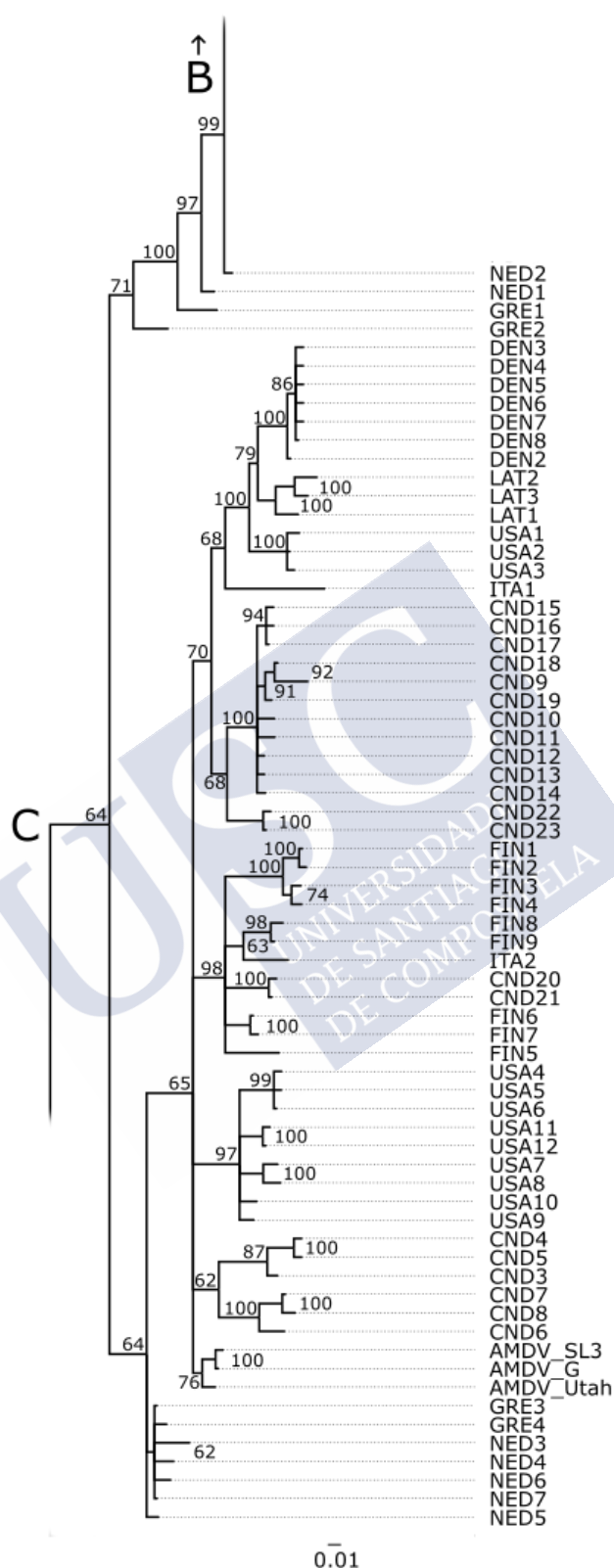


Figura 30. Fragmento del árbol filogenético bayesiano construido para la diana NS1 que representa una ampliación de la rama C identificada en la figura 27. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Las secuencias previamente descritas obtenidas de GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y n° (Anexo I). La barra de escala inferior representa el promedio de n° de sustituciones por sitio.

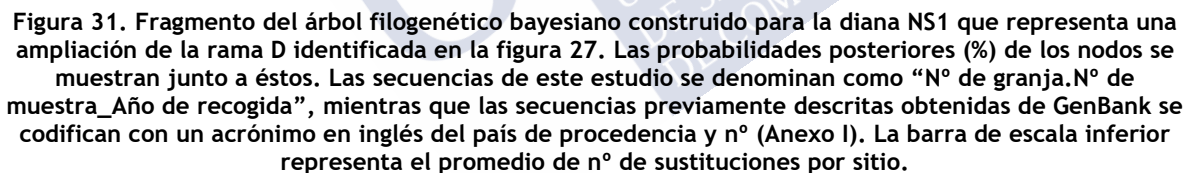


Tabla 31. Porcentajes de homología para la diana molecular NS1 entre las secuencias del clado II de este estudio (subclados IIa y IIb) (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “N° de granja.N° de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y n° (Anexo I).

	Subclado IIa			Subclado IIb
	540.1/2014	542.1/2017	545.1/2015	985.1/2015
POL18	94,5	93,5	92,6	91,4
POL17	93,9	93,5	93,9	89
ITA10	93,9	93,5	92,6	92,6
ITA1	87,8	88,1	87,8	85,9
SWE11	87,8	88,1	87,5	86,2
NED1	87,1	86,8	85,9	86,8
CND7	87,1	87,1	86,8	86,5
GRE2	86,8	86,8	86,5	86,5
POL4	85,6	85,3	85,6	84,7
DEN5	85,6	85,9	85,6	85,9

Tabla 32. Porcentajes de homología para la diana molecular NS1 entre las secuencias del clado III de este estudio (subclados IIIa y IIIb) (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “N° de granja.N° de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y n° (Anexo I).

	Subclado IIIa						Subclado IIIb
	610.1/2013	612.2/2016	619.2/2016	661.1/2013	661.4/2016	6109.1/2014	616.1/2016
SPA4	100	100	100	100	100	100	95,1
SPA3	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	94,8
SPA2	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	94,8
SPA1	98,7	98,7	98,7	98,7	98,7	98,7	94,5
AMDV-K	92,6	92,6	92,6	92,6	92,6	92,6	93,5
SWE11	92	92	92	92	92	92	92,3
FIN23	90,8	90,8	90,8	90,8	90,8	90,8	90,8
GRE4	89,3	89,3	89,3	89,3	89,3	89,3	89
ITA7	89	89	89	89	89	89	90,2
NED4	89	89	89	89	89	89	89,3
CHN6	89	89	89	89	89	89	89,6
DEN5	88,4	88,4	88,4	88,4	88,4	88,4	88,1
USA10	88,4	88,4	88,4	88,4	88,4	88,4	86,8

El número de **secuencias globales para el gen VP2** es sensiblemente más reducido que las disponibles para el gen NS1 (ver material y métodos), por lo que la comparación con cepas de otros países queda más restringida. En la figura 32 puede verse un esquema del árbol filogenético construido a partir de las secuencias del VP2 de este estudio y las descritas anteriormente en otros lugares, así como el mismo en detalle en las figuras 33 y 34. Como puede observarse, las secuencias de los clados I y IV se agrupan con otras secuencias descritas en diversos países (Figura 33; Tablas 33 y 34); en el caso del clado I, las secuencias de este estudio se agruparon principalmente con otras secuencias europeas de Polonia, Finlandia, Rusia y Bielorrusia, así como con algunas secuencias de China, mientras que las secuencias del clado IV se agrupan principalmente con cepas de Finlandia y Dinamarca, pero también de Rusia, Bielorrusia, Canadá y Estados Unidos. Por otro lado, el árbol también muestra que las secuencias de los clados españoles II y III están bastante conservadas y no tienen una relación muy estrecha con las reportadas en otros países (Figura 34; Tabla 35), presentando en cambio cierta relación entre ambos clados.

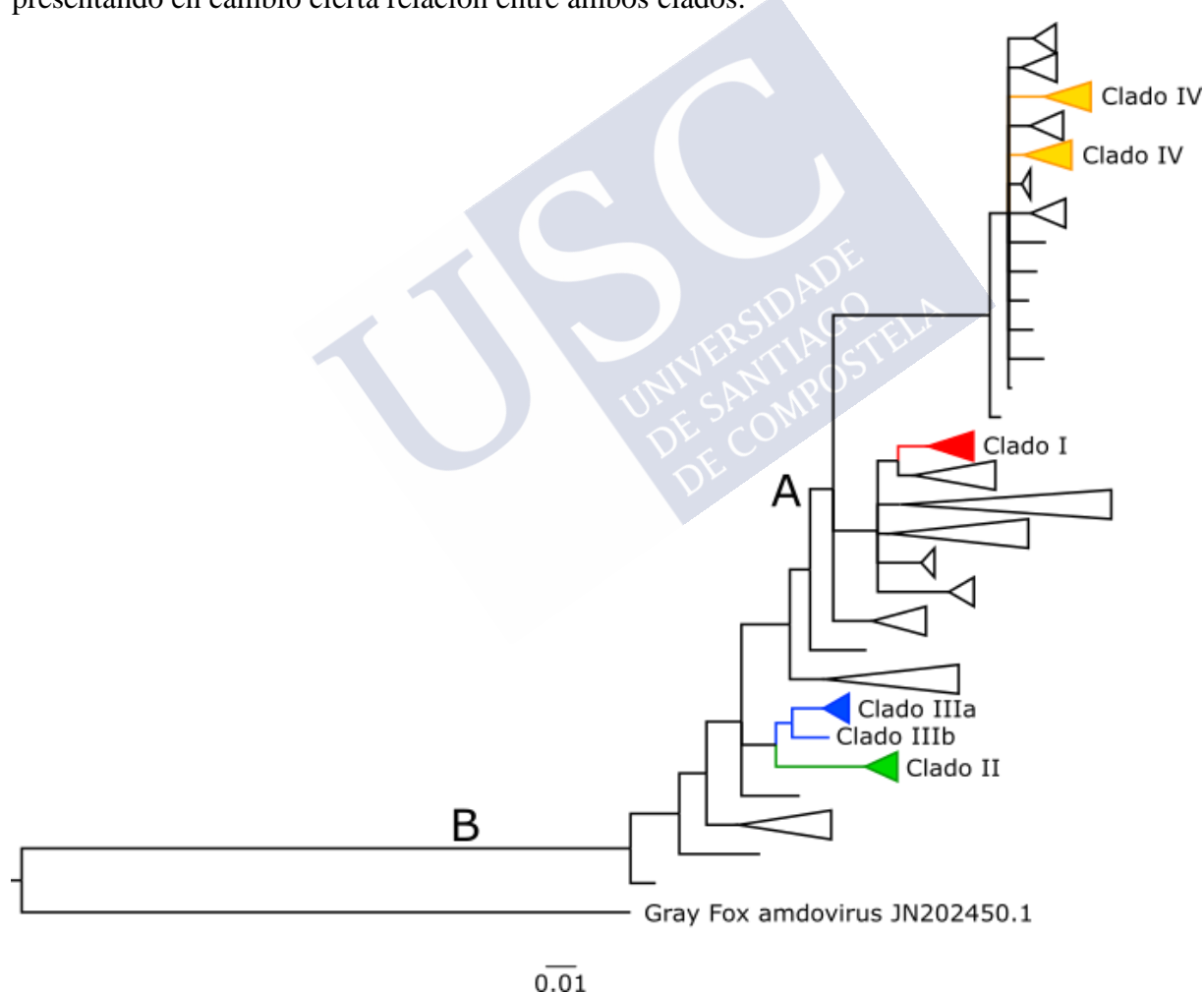


Figura 32. Representación esquemática del árbol filogenético bayesiano construido para la diana VP2 empleando las secuencias obtenidas en este estudio y 77 secuencias previamente descritas en GenBank (Anexo II), donde se muestra la situación de los clados y subclados españoles establecidos en este estudio. Las letras mayúsculas junto a los nodos (A, B) se corresponden con las ampliaciones de las ramas en detalle que se muestran en las figuras 33 y 34 respectivamente. La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio.



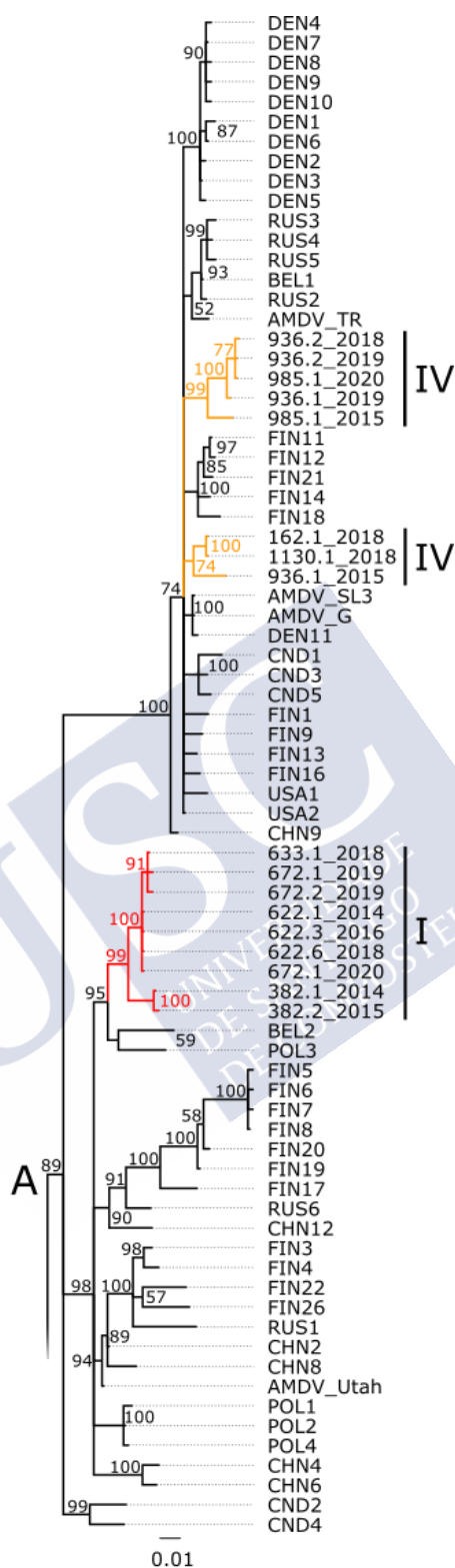


Figura 33. Fragmento del árbol filogenético bayesiano construido para la diana VP2 que representa una ampliación de la rama A identificada en la figura 32. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas obtenidas de GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo II). La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio.

**Tabla 33. Porcentajes de homología para la diana molecular VP2 entre las secuencias del clado I de este estudio (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo II).**

	622.1/2014	633.1/2018	672.1/2019	672.2/2019	672.1/2020	382.1/2014	382.2/2015
AMDV-UTAH1	97,4	97,2	97,1	97,1	97,4	97,4	97,2
CHN2	97,2	97,1	96,9	96,9	97,2	97,2	97,1
POL2	96,8	96,6	96,4	96,4	96,8	96,1	96,3
BEL2	96,6	96,8	96,6	96,6	96,6	95,7	95,5
POL4	96,6	96,4	96,3	96,3	96,6	96	96,1
POL3	96,4	96,3	96,4	96,1	96,4	96,1	96
POL1	96,4	96,3	96,1	96,1	96,4	95,8	96
FIN3	96,3	96,1	96	96	96,3	96	96,1
CHN6	96,3	96,1	96	96	96,3	95,7	95,5
CHN8	96,1	96	95,8	95,8	96,1	96,1	96

**Tabla 34. Porcentajes de homología para la diana molecular VP2 entre las secuencias del clado IV de este estudio (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo II).**

	936.1/2015	936.2/2018	936.1/2019	936.2/2019	985.1/2015	985.1/2020	162.1/2018	1130.1/2018
USA2	98	97,4	97,2	97,2	97,1	97,2	98,8	98,8
CND3	97,7	96,8	96,4	96,6	96,3	96,6	98,4	98,4
DEN3	97,7	96,9	96,8	96,8	96,6	96,8	97,9	97,9
BEL1	97,7	96,8	96,6	96,6	96,4	96,6	98,2	98,2
AMDV-TR	97,6	96,6	96,4	96,4	96,3	96,4	98	98
AMDV-G	97,6	96,9	96,8	96,8	96,6	96,8	98,4	98,4
DEN2	97,6	96,8	96,6	96,6	96,4	96,6	97,7	97,7
DEN4	97,6	96,9	96,8	96,8	96,6	96,8	97,7	97,7
RUS2	97,6	96,6	96,4	96,4	96,3	96,4	98	98
RUS3	97,6	96,3	96,1	96,1	96	96,1	97,7	97,7
CHN9	97,6	96,8	96,6	96,6	96,4	96,6	98,4	98,4
DEN5	97,6	96,8	96,6	96,6	96,4	96,6	97,7	97,7
CND4	93,3	93,7	93,9	93,9	93,1	93,9	93,4	93,4

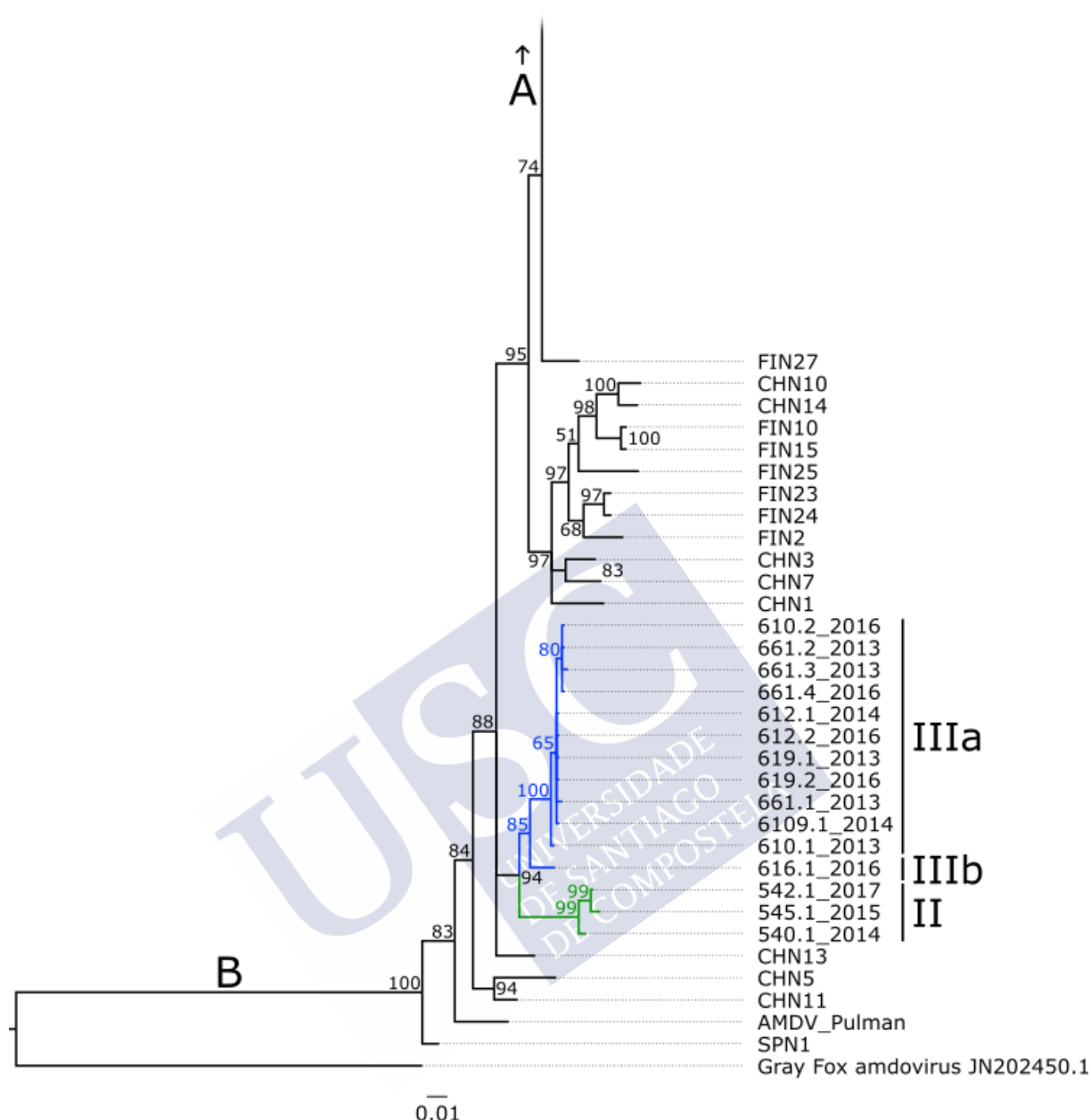


Figura 34. Fragmento del árbol filogenético bayesiano construido para la diana VP2 que representa una ampliación de la rama B identificada en la figura 32. Las probabilidades posteriores (%) de los nodos se muestran junto a éstos. Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas obtenidas de GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo II). La barra de escala inferior representa el promedio de nº de sustituciones por sitio.

**Tabla 35. Porcentajes de homología para la diana molecular VP2 entre las secuencias del clado II y III de este estudio (columnas) y las más cercanas previamente descritas obtenidas de GenBank (filas). Las secuencias de este estudio se denominan como “Nº de granja.Nº de muestra\_Año de recogida”, mientras que las secuencias previamente descritas en GenBank se codifican con un acrónimo en inglés del país de procedencia y nº (Anexo II).**

	Clado III										Clado II		
	Subclado IIIa									Subclado IIIb			
	610.1/2013	610.2/2016	612.1/2014	619.1/2013	661.1/2013	661.2/2013	661.3/2013	661.4/2016	6109.1/2014	616.1/2016	540.1/2014	542.1/2017	545.1/2015
CHN13	96,3	96,3	96,1	96,1	96	96,3	96,1	96,3	96,1	96,8	95	95	94,7
SPN1	96,1	96,1	96,3	96,3	96,1	96,1	96,3	96,1	96,3	95,5	95,2	94,9	94,5
POL4	95,8	95,5	95,7	95,7	95,5	95,5	95,3	95,5	95,7	95,2	94,5	94,2	93,9
CHN11	95,7	95,8	95,7	95,7	95,5	95,8	95,8	95,8	95,7	95,5	94,1	94,1	93,7
POL3	95,2	95,5	95,3	95,3	95,2	95,5	95,7	95,5	95,3	94,9	93,9	93,9	93,7
CND4	94,9	95,2	95	95	94,9	95,2	95	95,2	95	94,4	93,7	93,6	93,4
AMDV-UTAH1	94,9	94,7	94,9	94,9	94,7	94,7	94,5	94,7	94,9	94,4	93,4	92,9	92,6

El sector del visón en España se caracteriza por mantener un bajo porcentaje de granjas infectadas por el AMDV desde mediados de la década de 1990, principalmente debido a la aplicación voluntaria en la mayoría de granjas españolas del programa sanitario común desarrollado por la Asociación Gallega de Criadores de Visonos (AGAVI). Este programa incluye pruebas serológicas anuales mediante el test CIEP a toda la cabaña reproductora, altos estándares de bioseguridad y estrategias de erradicación como “test y sacrificio” o “*stamping-out*”, así como protocolos exhaustivos de limpieza y desinfección en el caso de brotes de AMDV. En este contexto, la caracterización molecular de las cepas del AMDV españolas y de las granjas francesas y portuguesas cercanas a la frontera con Francia con España se planteó como un paso necesario para comprender mejor la vía de contagio y contextualizar los estudios previos sobre el reservorio ambiental del virus y el papel de los fómites y visitantes de las granjas. Por otro lado, el presente estudio contribuye además a completar el conocimiento molecular de las cepas de AMDV desde un punto de vista global, puesto que reúne presumiblemente todas las cepas de AMDV implicadas en brotes en granjas de visón españolas desde el 2012 hasta el 2020, además de representar el primer trabajo en el que se describen secuencias de cepas de granja de origen portugués y francés.

En general, los análisis filogenéticos de las cepas de este estudio mostraron una clara relación geográfica entre los diferentes clados tal como ha sido también descrito por otros

autores (Christensen *et al.*, 2011; Nituch *et al.*, 2012; Ryt-Hansen *et al.*, 2017a), especialmente en el caso del árbol concatenado NS1+VP2. El árbol filogenético construido con el fragmento del gen NS1 sólo permitió la diferenciación de los grupos principales, pero no mostró la misma resolución que el árbol concatenado NS1+VP2, donde los clados obtenidos representan mejor las circunstancias geográficas, históricas y comerciales de las granjas; un ejemplo de ello sería el caso del cambio de la granja 985 del clado II al IV, una granja geográfica e históricamente más relacionada con las explotaciones de este último clado (Figuras 23 y 25). Esta mayor resolución ha sido mencionada previamente por otros autores (Leimann *et al.*, 2015; Hagberg *et al.*, 2017; Ryt-Hansen *et al.*, 2017a), señalando que el análisis de fragmentos más largos o incluso de todo el genoma permite establecer las relaciones filogenéticas entre diferentes cepas con una mayor resolución.

Debido a la mayor resolución obtenida a partir del árbol filogenético de los fragmentos concatenados NS1+VP2, la posterior discusión se centrará fundamentalmente en la clasificación obtenida mediante dicho árbol. En general, las granjas agrupadas en cada uno de los cuatro clados identificados en el árbol concatenado no sólo presentan relación geográfica entre ellas, sino que también comparten algunas características epidemiológicas que se detallan en la tabla 36. Hay que mencionar aquí que el trabajo experimental ha ido acompañado de una revisión en profundidad del historial sanitario de todas las granjas en el periodo 1995-2020 al objeto de dotar estos estudios de un adecuado marco epidemiológico.

**Tabla 36. Clasificación de las granjas incluidas en el estudio según los clados y subclados obtenidos a partir del árbol filogenético de fragmentos concatenados NS1+VP2, junto con diferentes datos epidemiológicos para cada clado/subclado.**

Clado	Subclado	Granjas incluidas	Observaciones
I		622	Cerca de Santiago de Compostela excepto la granja 382 (suroeste de Francia). Todos estos brotes son infecciones recientes. Las granjas 633 y 672 pertenecen al mismo propietario. Cepas 633-622-672, alta infecciosidad y virulencia en genotipos aleutianos, media/baja en los demás.
		633	
		672	
		382	
II		540	Área central de España (provincias de Madrid y Ávila). Infecciones antiguas y recientes, endémica durante décadas. La cepa obtenida de la granja 545, la única con infección activa en la actualidad, ha mostrado baja infecciosidad y virulencia.
		542	
		545	
III	IIIa	661	Grupo de granjas cercanas a A Coruña con una distancia máxima de 2.5 km entre ellas y con infección endémica desde 2012. Cepas de alta infecciosidad y mediana virulencia.
		610	
		612	
		619	
	IIIb	6109	Situada a 50 Km de las granjas del clado IIIa y ubicada en el área geográfica del clado I. Relaciones comerciales y de vecindad con granjas de ambos clados. Brotes en 2003-2005 y en 2016, granja negativa desde 2017. Cepa de baja infecciosidad y virulencia.
		616	
IV		162	Suroeste de Galicia y zona fronteriza adyacente de Portugal. Las granjas españolas (985 y 936) sufrieron brotes esporádicos; se les supone baja infecciosidad y virulencia. Las granjas portuguesas (162 y 1130) pertenecen a un mismo propietario; a diferencia de las cepas españolas de este clado, las cepas portuguesas mostraron una alta infecciosidad, dando lugar a un brote epizootico en 2014 que desembocó en infección endémica en ambas granjas, su virulencia se califica como baja.
		1130	
		985 (brotes en 2015 y 2020)	
		936 (brotes en 2015 y 2018/2019)	

Las secuencias del clado I pertenecen a cuatro granjas, tres de ellas en el noroeste de Galicia y la otra en el suroeste de Francia. Mientras que en tres de estas granjas se produjeron brotes epizooticos de fulminante propagación, la cuarta granja (672) ha padecido sólo brotes esporádicos y se ha podido controlar hasta ahora mediante el sistema “test y sacrificio”.

La granja 622 sufrió un brote epizootico en 2014 que se extendió rápidamente dentro de la granja, posiblemente impulsado por el hecho de que parte de la población eran visones de genotipo aleutiano. A partir del brote, el granjero decidió deshacerse de los genotipos aleutianos y mantener la granja con infección endémica, realizando una selección intensiva de reproductores tolerantes/resistentes al AMDV mediante el test IAT reforzada con la implementación de procedimientos de limpieza y desinfección intensivos. Esta granja estuvo infectada en el pasado y también acometió reformas en 2014 que implicaron excavaciones en el terreno de la granja, así como la compra de instalaciones en otros países europeos (jaulas, nidos). Por lo tanto, el origen de esta cepa podría estar en reservorios del virus que infectó esta explotación en el pasado puesto que, aunque negativa desde 1996, padeció un rebrote esporádico en 2003 (3% de prevalencia) y presentó positivos aislados en 2011 y 2013 (1 en cada caso). Además, en base a las diferencias filogenéticas, puede descartarse el contagio a partir de las granjas de los demás clados este estudio, siendo improbable también que se



contagiara de alguna de las otras granjas de este clado ya que su infección de produjo 3 años antes de los brotes de las granjas 633 y 672 y no tuvo ninguna relación con la granja francesa. No obstante, una explicación igualmente plausible sería la introducción de AMDV a través del material de granja comprado ese año en otros países. El comercio internacional es una ruta de infección que también han sugerido otros autores (Leimann *et al.*, 2015; Canuti *et al.*, 2016; Kowalczyk *et al.*, 2019b); esta última hipótesis vendría respaldada en este caso por el análisis filogenético global, donde se puede observar que las secuencias de esta granja están relacionadas con otras secuencias contemporáneas descritas anteriormente en Polonia, los Países Bajos y Grecia (Figuras 29 y 33; Tablas 29 y 33). Por otro lado, el hecho de no disponer de secuencias de las cepas activas en esa granja en los años 90 y 2003 imposibilita contrastar la hipótesis de la reinfección a partir de reservorios de la propia granja; no obstante, en caso de que se tratase de una reinfección a partir del reservorio ambiental, esto implicaría que dicho reservorio se habría mantenido viable durante un periodo de tiempo de al menos 10 años.

De manera similar a la granja 622, la granja 633 experimentó un brote epizootico detectado a principios de 2018 en una nave de pasillos múltiples que albergaba visones de genotipos aleutianos, pero en este caso el granjero decidió emprender una estrategia de erradicación tipo “*stamping-out*” todavía en ejecución. Esta granja nunca estuvo infectada con anterioridad, por lo cabe descartar en este caso el reservorio ambiental; con todo, presentó un animal inconcluyente al CIEP en enero del 2016 (variedad Blue-Iris, genotipo aa). Uno de los posibles orígenes para este brote es que la infección proceda de la granja 622, debido a su proximidad y potenciales interrelaciones directas o indirectas entre el personal o visitantes de ambas granjas; sin embargo, la homología entre ambas cepas, aun siendo alta, no es completa, especialmente para el gen NS1 (NS1=98,4% y VP2=99,8%, Tabla 28). Por otro lado, la granja 633 compró jaulas y nidos en otro país europeo en 2017, por lo que la hipótesis de introducción de AMDV a través del comercio internacional también es plausible en este caso y estaría respaldada por el análisis filogenético global (Figuras 29 y 33; Tablas 29 y 33). Por último, una explicación alternativa al origen de este brote se discute a continuación al analizar los brotes de la última granja española de este clado.

La granja 672 estuvo infectada hasta 2003 y, tras un proceso de “*stamping-out*”, presentó un brote esporádico en 2005 (6 positivos, 0,43%) que fue controlado mediante el sistema “test y sacrificio”. Posteriormente, en enero de 2013, presentó 23 animales inconcluyentes al test CIEP, y un positivo y 3 inconcluyentes en enero de 2014; cabe mencionar que en dichos años se realizaron movimientos de tierra en esa granja. Desde entonces, la granja se mantuvo libre hasta enero de 2018, momento en que se detectaron 5 positivos en un lote de animales recién trasladados desde la granja 633 justo antes de ser detectada la infección en esta última granja; de esta forma, se asume que la vía de contagio en este brote fue la incorporación de animales infectados desde 633, siendo un ejemplo del riesgo que se asume al mover animales antes de la realización del test anual. Aunque este brote se está controlando satisfactoriamente mediante la estrategia de “test y sacrificio”, todavía no se ha conseguido erradicar la enfermedad de la granja, habiéndose producido rebrotes durante todo el periodo

2018/2019/2020 (8, 28 y 5 positivos, respectivamente), sin que esté claro el reservorio del virus ni las vías de contagio en cada uno de esos eventos, pero sí que se trata de cepas idénticas o estrechamente relacionadas (tabla 28 y figura 25).

Esta granja pertenece al mismo propietario que la 633, pero han estado adscritas a dos ADSG diferentes en el periodo entre el año 2012 y agosto del 2020, por lo que la integración de la información sanitaria no fue tan alta como sería deseable. Aunque en general el movimiento de animales se produjo siempre de la 633 a la 672, ocasionalmente ha habido movimientos en el sentido contrario, como en los años 2015 y 2016 por el traslado de algunos animales (entre 100 y 300) en los meses de septiembre y octubre. Además, y con un potencial impacto sanitario mucho mayor, en julio de 2017 (el año previo a la detección del brote en 633) se trasladaron 1.800 animales de la 672 a la 633 para completar la ocupación de la nave de pasillos múltiples recién estrenada en ese momento, la misma nave en que se alojaban la mayoría de los animales de genotipo aleutiano. Se da además el caso de que las instalaciones de peletización comunes se localizan en la granja 633, por lo que varias veces al año se peletizan en dicha granja aquellos animales sacrificados en la granja 672. La homología entre la cepa de 633/2018 y 672/2019 es del 99,6 y 99,8% para los genes NS1 y VP2 respectivamente (un nucleótido de diferencia en ambos casos), lo que respalda el origen de este brote; sin embargo, la comparación entre las cepas 633/2018 y 672/2020 presenta una homología del 98,4 y 99,8% para NS1 y VP2 respectivamente (cinco y un nucleótidos de diferencia), mostrando que se trata de cepas que han divergido ligeramente (Figura 25, Tabla 28).

En base a este conjunto de datos epidemiológicos, homología entre cepas y filogenia, cabe pensar que los positivos/inconcluyentes aislados detectados en la 672 en los años 2013 y 2014 sean la manifestación de un reservorio ambiental en la granja, reservorio que habría finalmente infectado la granja 633 en algún momento posterior al test anual de enero de 2017; incluso el animal positivo/inconcluyente detectado en la granja 633 en enero de 2016 podría ser un antecedente de este brote. La filogenia sustenta la hipótesis de que el brote de 2018 en 672 procede de los animales trasladados poco antes desde 633. El diferente curso de la infección en ambas granjas puede deberse a la presencia de una gran población de animales de genotipo aleutiano en la 633 unido a una baja virulencia mostrada hasta ahora por estas cepas en los demás genotipos. La ligera diferencia entre las cepas aisladas en 672 en los años 2019 y 2020 sugiere que quizá, a diferencia de 2019 donde la infección provino de un primer pase en genotipos aleutianos en 633, la cepa del 2020 de 672 podría pertenecer de nuevo al reservorio original de la granja.

El tiempo de seroconversión varía según la dosis infectante (De Geus *et al.*, 1996; Farid y Hussain, 2020) y la vía de infección (Farid y Hussain, 2019), así como con la cepa y genotipo del visón (Aasted *et al.*, 1984; Hadlow *et al.*, 1983). Por tanto, los resultados inconcluyentes al test CIEP pueden darse cuando se toma la muestra durante el periodo de seroconversión, especialmente si éste se alarga (De Geus *et al.*, 1996), así como también cuando se trata de la forma inaparente de la AD (Aasted y Hauch, 1988). Además, el test CIEP no puede considerarse un test objetivo en tanto que la lectura del resultado se ve influenciada por

factores como haber encontrado o no previamente más reacciones positivas en esa granja (Dam-Tuxen *et al.*, 2014). Se ha observado también que este tipo de incidencias en el test CIEP en granjas negativas aumentan el riesgo de aparición de positivos en la siguiente campaña (Chriél, 2000b). Así, todos o parte de estos hechos podrían explicar la frecuencia de resultados positivos/inconcluyentes puntuales en 672 durante el periodo 2013-2014 y posterior estabilización como granja negativa en el periodo 2015-2017; pero no puede soslayarse que la recurrencia de este tipo de eventos en la granja 672, unida al intercambio de animales, pueda estar relacionada con el brote que ha afectado a las dos explotaciones de este mismo granjero a partir del 2018. De hecho, esta recurrencia de incidencias en los test serológicos anuales podría ser la parte “visible” de una interrelación entre el reservorio ambiental e infecciones inaparentes que no llegan a producir explosiones epizooticas ni sintomatología clínica que las evidencie ya que en la mayoría de los casos la posible transmisión animal-animal se corta en el periodo de peletización en noviembre y en el test anual en diciembre-febrero. En este contexto, no sólo la ubicación de las instalaciones comunes de peletización en la granja 633 entrañan un riesgo, sino que, y de modo mucho más significativo, los movimientos de animales de 672 a 633 en los años 2015-2016-2017 han supuesto un grave riesgo epidemiológico; y estos riesgos pueden haberse materializado en el positivo/inconcluyente detectado en 2016 y en el brote epizootico del 2018. La infravaloración del verdadero significado de estos “incidentes” en los test serológicos conduce a una incorrecta clasificación sanitaria de las granjas, lo que a su vez incrementa el riesgo.

Las ligeras divergencias entre las cepas españolas de este clado pueden ser reflejo de divergencias preexistentes en los reservorios ambientales de las granjas 622 y 672, mutaciones producidas en su pase por los genotipos aleutianos presentes en las granjas 622 y 633, o reflejar el origen externo en otro país productor. No obstante, en este último caso debemos aceptar el hecho sorprendente de la similitud entre cepas importadas desde otro/s país/es en años diferentes y a granjas distintas.

En cualquier caso, la discusión del brote de las granjas 633 y 672 ilustra varias facetas clave en la epidemiología de la AD, a saber:

- a. La alta persistencia ambiental, que podría ser de más de 10 años en algunos casos (también sugerida en los brotes de las granjas 616, 622, 936, 985 y 545), y que podría estar entrelazada o no con la presencia de infecciones inaparentes que sólo emergen esporádicamente en los test serológicos anuales en forma de resultados positivos/inconcluyentes aislados.
- b. El valor predictivo que pueden llegar a tener los positivos/inconcluyentes aislados que se presentan de modo recurrente en algunas granjas negativas.
- c. La transmisión horizontal indirecta intra-granja a partir de fómites o terreno contaminado, pese a que se le supone una carga ambiental marginal tras los procesos de limpieza y desinfección que acompañaron a los procesos de erradicación previos.
- d. La transmisión horizontal indirecta entre granjas por carcasses para peletización, trabajadores o materiales compartidos.

- e. La transmisión horizontal directa por la entrada de animales desde otra explotación antes de la realización del test serológico anual en la granja de origen o por una calificación sanitaria incorrecta.
- f. El efecto amplificador del virus que tienen los genotipos aleutianos.

En conjunto, las tres granjas españolas del clado I reflejan una situación complicada debido a la concatenación temporal de brotes en las tres granjas, la existencia de potenciales reservorios ambientales en dos de ellas (622 y 672), pero no en la tercera (633), la posible implicación de las vías horizontales directa e indirecta, a través del movimiento de animales, las instalaciones comunes de peletización, el personal de granja o visitantes y la coincidencia con la entrada de material de granja proveniente de otros países donde se han detectado cepas relacionadas. El estudio filogenético descarta además la relación de estos brotes con el resto de los incluidos en este trabajo. Finalmente, la filogenia en este clado ilustra la limitación de los estudios filogenéticos basados en la secuenciación de fragmentos del genoma en lugar del genoma completo, tal y como muestran los trabajos de otros autores (Hagberg *et al.*, 2017; Virtanen *et al.*, 2019).

Con respecto a la granja 382, el grado de homología con el resto del clado es algo menor (98,1 y 98,2% para NS1 y VP2 respectivamente, Tabla 28); además, las secuencias detectadas también están relacionadas con otras secuencias europeas (Figuras 29 y 33; Tablas 29 y 33). Sin embargo, la falta de datos epidemiológicos de esta granja imposibilita hacer una conjetura sobre el origen de la infección. Esta granja realizó un proceso de “*stamping-out*” en 2014, siendo de resaltar que al final de dicho proceso se detectó la persistencia de contaminación por AMDV en las instalaciones de peletización, dando así una segunda oportunidad para completar con éxito dicho proceso. La granja ha permanecido negativa hasta el año 2018, año en que cesó su actividad.

En cuanto a las secuencias del clado II, todas ellas pertenecen a tres granjas ubicadas en el centro de España que han permanecido infectadas endémicamente durante décadas. Desde un punto de vista epidemiológico e histórico, estas granjas están relacionadas con las granjas fundadoras establecidas en esta región en los años 50 (García-Mata, 1990) y se han mantenido prácticamente aisladas del resto del sector español, por lo que es posible que estas cepas de AMDV representen las antiguas cepas de esta área. Este hecho podría explicar por qué estas secuencias parecen ser las más conservadas en este estudio (Figura 25), situándose también a nivel global entre las secuencias más antiguas entre todas las descritas (Figuras 31 y 34).

La granja 542 es una granja con infección endémica que cesó su actividad en 2015 y de la que se tomaron muestras ambientales en 2017, a partir de las cuales se han obtenido las cepas de este estudio. En este sentido, el método de obtención de las cepas de esta granja muestra la posibilidad de emplear los métodos moleculares para la amplificación y secuenciación de AMDV a partir de muestras ambientales incluso en granjas que han cesado su actividad años atrás, ilustrando así la posible persistencia en el reservorio ambiental.

La granja 540 realizó con éxito un procedimiento de “*stamping-out*” en 2014 y desde entonces se ha mantenido como granja negativa (último test en enero 2019). Es de señalar, no

obstante, que los test ambientales realizados detectaron persistencia de la contaminación en la madera de los nidos al final del proceso de limpieza y desinfección, dando así al granjero una segunda oportunidad de desinfección previa a la reintroducción de una cabaña negativa y demostrando por tanto su utilidad en la verificación de la efectividad de estos procesos.

La granja 545 realizó también con éxito un proceso de “*stamping-out*” en 2012, cuando reinició su actividad tras varios años cerrada. A finales de 2015 se detectó un brote que ha permanecido activo desde entonces, aunque con prevalencias muy bajas (último test en enero 2017; 0,38%). En lo referente a su comportamiento, a esta cepa se le atribuye una baja infecciosidad y virulencia en base al carácter esporádico de los brotes y la ausencia de sintomatología clínica. Considerando la gran similitud con las demás cepas de esta área geográfica y la extrema resistencia del AMDV a las condiciones ambientales, el brote inicial de 2015 en la granja 545 puede estar relacionado con el mantenimiento de los reservorios ambientales de AMDV (Farid *et al.*, 2012; Cepica, 2016; Fernández-Antonio, 2016), una posibilidad que vendría apoyada por el hecho de que se realizaron movimientos de terreno en los meses previos a dicho brote. Por otro lado, los rebrotes posteriores estarían posiblemente más relacionados con la presencia de animales infectados no detectados, dado que durante ese periodo la granja sólo realizó un test completo a todos los animales (enero 2016; 0,65% de prevalencia). Alternativamente, podría tratarse de una transmisión horizontal indirecta a partir de la granja 542, que se encuentra situada a 1,5 Km de distancia y con cuyas cepas presenta un grado de homología más alto (99 y 99,6% para los genes NS1 y VP2 respectivamente) que con las de la granja 540 (98,1 y 99%), geográficamente más alejada (Tabla 28). Pese a que esta granja adquirió sus animales en la granja 661 en junio de 2012, justo en el momento inicial del brote en esta última, el análisis filogenético permite descartar dicha procedencia; aún siendo un golpe de suerte obtener una cabaña negativa de una granja positiva al inicio de un brote en la granja de origen, tenemos precedentes de ello en los registros de la ADSG, así como se ha dado también y con mayor frecuencia el caso contrario (adquirir el virus junto con los animales supuestamente negativos) (datos propios no publicados).

En cuanto al clado III, todas las granjas de las que proceden estas secuencias se encuentran en la provincia de A Coruña (Figura 26B), estando además la mayoría de ellas (todas las del subclado IIIa) muy próximas entre sí. Las secuencias del subclado IIIa presentan una identidad total para el gen NS1 y casi total para el VP2 (99,6-100%) (Tabla 28). Teniendo en cuenta además la concatenación temporal de los brotes en las cinco granjas de este subclado, se asume que el brote epizootico de la granja 661 en 2012 fue la fuente de infección para las demás granjas, ya fuese de manera directa o indirecta, debido a su ubicación cercana e intercambio de personal de granja (granja C<sub>1</sub> del estudio 1 de esta tesis), materiales e incluso animales. La evolución de la prevalencia al test CIEP en todas las granjas de este subclado muestran que esta cepa es de alta infecciosidad; así mismo, los resultados reproductivos y los datos de mortalidad sitúan la virulencia de esta cepa como media/moderada. Como estas cepas parecen estar bastante conservadas en relación con el resto de cepas descritas a nivel global (Figuras 31 y 34), cabe pensar que el brote inicial de 2012 en la granja 661 se debió a la existencia de reservorios ambientales de antiguas infecciones por AMDV, más aún



teniendo en cuenta que esta granja había sufrido varios brotes esporádicos durante el periodo 2002-2008 que fueron controlados mediante las estrategias de “test y sacrificio” y “*stamping-out*”. Un punto común entre este brote y los descritos en las granjas 622, 672 y 545 es la realización de reformas que implicaron excavaciones en el terreno antes de la aparición del brote. Otro punto común es la aparición de brotes esporádicos previos o resultados positivos/inconcluyentes aislados (granjas 622 y 672), lo que va asociado a un mayor riesgo de rebrote (Chriél, 2000a). Por otro lado, la granja 616 (subclado IIIb) es un caso particular ya que además del brote esporádico de 2016 (origen de la cepa de este estudio) presentó un brote en 2003 que obligó a la granja a mantener un grupo libre y otro infectado, siguiendo luego una estrategia de test y sacrificio que concluyó con éxito en el año 2006; actualmente este tipo de sistema de control está en desuso, y su éxito depende en gran medida de que la capacidad infectiva de la cepa implicada sea baja. En nuestra opinión, es posible que la cepa de esta granja represente una variante menos infecciosa y virulenta que las pertenecientes al subclado IIIa, pudiendo proceder en ambos casos de una cepa común que habría infectado las granjas de esa área geográfica antes de que la aplicación de la estrategia de “test y sacrificio” ejecutada entre finales de los 80 y primera mitad de los 90 erradicase la enfermedad; lamentablemente, la falta de muestras previas al año 2013 imposibilita comprobar dicha hipótesis. Con todo, los clados I y III presentan granjas en las que el control y erradicación han seguido caminos divergentes entre granjas de un mismo clado. El control y erradicación fue posible en aquellas granjas con genotipos no aleutianos y cepas de baja infecciosidad (granja 672 del clado I y 616 del IIIb). En aquellos casos en los que el brote se expandió con rapidez, en un periodo de meses, ya fuera por la presencia de genotipos aleutianos (granjas 622 y 633 del clado I) o por la mayor infecciosidad de las cepas (todas las granjas del clado IIIa), la despoblación total de la granja (“*stamping-out*”) o la evolución hacia una infección endémica y selección de animales capaces de convivir con la infección fueron las únicas opciones.

Finalmente, el clado IV representa el más heterogéneo de todos los grupos de este estudio desde un punto de vista filogenético; sin embargo, todas sus secuencias pertenecen a cuatro granjas situadas en la misma área geográfica (figura 26C). Las granjas españolas de esta región se fundaron en los años 60, siendo las más antiguas junto con las del centro del país; habiendo sido en el pasado la densidad de granjas en esta zona mayor que en la actualidad. Otra característica común a todas las granjas de este clado es la de haberse mantenido negativas durante un periodo prolongado (un periodo de 15 o más años). A pesar de la agrupación de las cepas de estas granjas en un mismo clado, no se dispone de pistas sobre el origen de la infección en los **brotes iniciales** ni se ha podido establecer ningún tipo de nexo epidemiológico entre ellos (brotes 162/2014, 985/2015, 936/2015 y 936/2018), aunque en el caso de los **brotes derivados** posteriores si existen ciertas evidencias que permiten sugerir posibles vías de infección. Uno de ellos es el caso obvio del brote de Portugal, donde presumiblemente una granja se infectó primero y contagió a la segunda del mismo propietario a través del intercambio de animales, operarios, pienso o materiales. Una segunda vía de infección es la asociada al brote de la granja 985 en el año 2020, donde la filogenética muestra un grado de identidad casi total con las cepas de la granja 936 de los años 2018 y



2019 y donde debe suponerse que ha habido una transmisión horizontal desde la granja 936 a la 985 por vías que no pueden ser reconstruidas con certeza en base a la información facilitada por el granjero. Finalmente, el brote de la granja 936/2018 tuvo continuidad en el año siguiente y suficiente homología entre cepas (99,6 y 99,8% para los genes NS1 y VP2 respectivamente) como para ser considerado el mismo brote, que no pudo ser controlado mediante el sistema de “test y sacrificio” por interrupción de la actividad de esta granja en el año 2019. Puesto que las granjas españolas de este clado estuvieron infectadas durante muchos años antes de la erradicación en los años 90, la reinfección a partir del reservorio ambiental debe ser considerada como una posibilidad. Se carece de historial analítico de los test serológicos de las granjas portuguesas en los periodos previos al brote, pero el granjero asegura que nunca antes habían estado infectadas; si esto es así, el reservorio ambiental puede descartarse como origen del brote. Debe mencionarse que en toda esta zona se ha documentado una población estable de visón silvestre desde los años 80 debido a fugas intencionadas o accidentales (Vidal-Figueroa y Delibes, 1987; Rodrigues *et al.*, 2014), habiéndose descrito una seroprevalencia al AMDV de aproximadamente 47% en visón americano silvestre en muestras provenientes fundamentalmente de la zona española de esta área (Mañas *et al.*, 2016); por este motivo, la transferencia del virus desde el reservorio silvestre no puede descartarse en estos brotes. La recombinación genética entre diferentes cepas de AMDV ha sido descrita por diversos autores (Canuti *et al.*, 2016; Virtanen *et al.*, 2019) y podría haber ocurrido también entre las diversas cepas inicialmente presentes en esta área geográfica, tanto en la población de granja como en la silvestre. Esto podría explicar por qué las secuencias NS1 y VP2 de la granja 985 (985.1/2015) se agrupan en clados diferentes en los árboles filogenéticos según el gen estudiado, o por qué las cepas detectadas en los brotes de la granja 936 en 2015 y 2018 presentan una homología moderada (92.6% para NS1; 96.9% para VP2) a pesar de su relación filogenética y proximidad temporal. Finalmente, debemos señalar que la infecciosidad y virulencia de las cepas españolas de este clado puede calificarse como baja, y que para el caso de la cepa portuguesa la infecciosidad es a todas luces alta, siendo, no obstante, de baja virulencia.

Como se evidencia en este estudio, **en España conviven al menos 4 clados del AMDV bien diferenciados y localizados geográficamente**, con capacidad infectiva y virulencia características a cada una de las cepas, pero no necesariamente compartidas por todo el clado. En este sentido es importante que las granjas infectadas eviten la entrada de nuevas cepas que podrían dar lugar a una dinámica de infección/enfermedad diferente y a posibles recombinaciones de resultado impredecible, y en relación con esto cabe mencionar que las medidas de bioseguridad discutidas a lo largo de esta tesis son también de aplicación para la autoprotección de las granjas infectadas.

La estrategia de “*stamping-out*” tiene un alto coste económico y sus resultados son inciertos, por lo que no todos los granjeros quieren o pueden afrontarla; a modo de ilustración, los altibajos en los resultados de dichas actuaciones en la granja 661 previas al brote de 2012 son un ejemplo de la incertidumbre y dificultades asociadas a la erradicación de la enfermedad en estos casos. La estrategia “**test y sacrificio**” está asociada a un coste menor,

pero sólo es posible bajo determinadas circunstancias, básicamente cuando la infecciosidad/virulencia de la cepa es baja o moderada. Además, al no pasar por un vacío sanitario que facilite la completa desinfección, esta estrategia está seguramente asociada a un mayor riesgo de emergencia del reservorio ambiental y presencia de animales con infección inaparente no detectable mediante los controles serológicos de rutina. En realidad, es concebible que reservorio ambiental e infecciones inaparentes con bajos títulos de anticuerpos se retroalimenten entre sí.

**Los protocolos de limpieza y desinfección** ligados a los programas de erradicación han demostrado ser lo suficientemente efectivos para mantener, en la mayoría de los casos, las granjas libres de infección detectable durante un periodo de años; en este sentido, la monitorización de los procesos de “*stamping-out*” mediante **test ambientales** ofrece al granjero una segunda oportunidad de completar con éxito un proceso que tiene siempre asociado un alto coste. No obstante, la erradicación de la enfermedad en granjas infectadas está sometida a riesgos en parte aún no bien definidos, pero que parecen implicar la emergencia de reservorios ambientales del virus y la presencia de animales infectados que en ocasiones pueden resultar indetectables o dar resultados contradictorios en los test serológicos actualmente en uso.

**Como opinión personal del autor**, a la luz de los resultados de esta tesis surge la siguiente reflexión. Respecto a aquellos brotes donde el estudio filogenético muestra un posible origen en el reservorio ambiental, ninguno ha podido ser probado de forma concluyente al carecer de muestras de las cepas que infectaron a esas granjas en el pasado. Son las relaciones filogenéticas entre las cepas de las diferentes granjas de este estudio y su posición dentro de los árboles globales lo que lleva a formular dicha hipótesis, respaldada además por datos epidemiológicos y la aparición previa de positivos/inconcluyentes aislados en el historial de dichas granjas. Sin embargo, el reservorio ambiental en granjas negativas sólo pudo ser detectado en el caso muy concreto de la granja C<sub>1</sub> del estudio 1, donde la presencia de una carga vírica suficientemente alta unida al conocimiento previo de que había un trabajador compartido con una granja positiva facilitó el éxito del muestreo. En base a ello, es lógico concluir que para el estudio de la presencia de dicho reservorio en granjas negativas se debería emplear un test serológico de mayor sensibilidad que el test CIEP para aplicarlo de forma selectiva allí donde se sospechan estas reemergencias. En ausencia de dicho test alternativo los animales positivos/inconcluyentes aislados detectados en los test rutinarios deben ser investigados con los medios disponibles. El primero de ellos será la confirmación de la seroconversión mediante un test serológico, preferiblemente un método alternativo al usado como test de rutina, como el **CIEP indirecto** (Aasted y Cohn, 1982), de mucha mayor sensibilidad que el test CIEP. Paralelamente debe tratar de demostrarse la presencia del virus en los órganos linfoides (bazo y linfonodo mesentérico) mediante **amplificación por PCR**, seguida de **secuenciación y estudio filogenético**. Estos estudios deben completarse con el **diagnóstico histopatológico** de los órganos internos, al menos de hígado, riñón, pulmón y bazo. En este tipo de granjas se deberían además articular programas de muestreo serológico previos al sacrificio del mes de noviembre, para aumentar de ese modo las probabilidades de

detectar positivos aislados. Una vez confirmada la presencia de infecciones inaparentes, los resultados podrán ser reflejados en su calificación sanitaria y adoptar entonces medidas tales como protocolos de desinfección intensivos, eliminación de los genotipos aleutianos y restricción en el movimiento de animales.

El presente capítulo de esta tesis (4.4) reproduce contenidos de la siguiente publicación:

Prieto, A., **Fernández-Antonio, R.**, López-Lorenzo, G., Díaz-Cao, J.M., López-Novo, C., Remesar, S., Panadero, R., Díaz, P., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Fernández, G., 2020. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus causing outbreaks in mink farms from Southwestern Europe: a retrospective study from 2012 to 2019. J. Vet. Sci. 21(4), e65. Editorial: The Korean Society of Veterinary Science (eISSN: 1976-555X).





## **CAPÍTULO 5**

# **CONCLUSIONES**

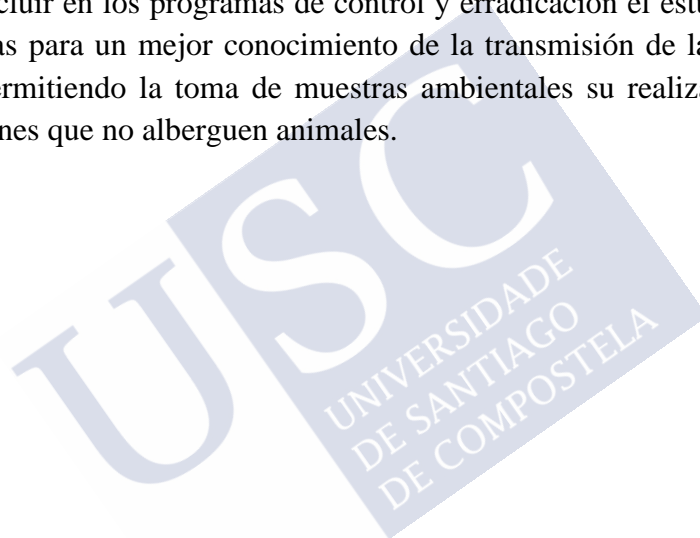






1. La qPCR es una herramienta útil para la detección y cuantificación del AMDV en muestras ambientales tomadas en granjas de visón con distintas situaciones epidemiológicas. Este método tiene importantes aplicaciones en los programas de control de la AD: evaluación del impacto de las medidas de control, estudio de las rutas de transmisión y ayudar a aumentar la concienciación de los granjeros en relación con las medidas de bioseguridad.
2. Los métodos de extracción del ADN influyen en la capacidad de detección de la qPCR y en la cuantificación de la carga viral en este tipo de muestras. De los dos métodos ensayados, el mejor resultado se obtuvo empleando como método estándar un kit de extracción genérico complementado con un kit específico para muestras de suelos, que pueden emplearse o bien en paralelo a fin de maximizar simultáneamente la detección de positivos y el recuento de la carga vírica, o bien en serie, usando el segundo método como test complementario en caso de resultados negativos con el primer kit.
3. La carga vírica es más elevada en aquellos elementos y superficies en contacto directo con los animales, pero el virus está presente también en superficies sin contacto directo con los mismos, incluso en aquellas situadas en la periferia de la granja. Esto prueba la importancia de aplicar correctas medidas de bioseguridad relativas a personas y materiales, así como el establecimiento de programas de limpieza y desinfección que incluyan todas las posibles zonas contaminadas.
4. Los visitantes se contaminan por la mera presencia en las naves que alojan a los animales, sin necesidad de que entren en contacto con los mismos. Los protocolos de bioseguridad deben incluir el uso de EPI certificados y su adecuada utilización. Las calzas, incluso en el caso de estar certificadas, no aseguran la no contaminación en las condiciones de los suelos de las granjas, por lo que es aconsejable la utilización de botas de goma y su adecuada desinfección entre explotaciones.
5. El estudio filogenético realizado muestra una mayor resolución cuando se emplean los fragmentos concatenados de los genes NS1 y VP2 que cuando se estudia cada uno de estos dos fragmentos por separado. El árbol concatenado agrupa estas cepas en 4 clados según un patrón de distribución geográfica consistente.
6. El estudio filogenético ha ayudado a esclarecer el origen de la mayoría de los brotes de dicho periodo y sugiere que el reservorio ambiental ha jugado un papel importante en el resurgimiento del virus en granjas de las que había sido previamente eliminado. La filogenética respalda así mismo el origen de aquellos brotes causados por trabajadores portadores de contaminación o movimiento de animales desde granjas infectadas a otras libres.
7. En base a las anteriores conclusiones se proponen las siguientes mejoras en los programas de prevención, control y erradicación:
  - a. En granjas negativas. Realizar controles ambientales entre los test serológicos anuales, especialmente cuando se detecte un incremento del riesgo epidemiológico. Estos controles ambientales entre periodos de test serológico son una herramienta eficaz para la detección temprana de la infección o del riesgo de que ésta se produzca.

- b. En granjas positivas. Evaluación de los riesgos y contramedidas de bioseguridad basada en datos objetivos y específicos de la distribución y carga ambiental del virus, usando para ello programas específicos de muestreo ambiental.
- c. Evaluar mediante muestras ambientales el impacto de las medidas de desinfección de granja en los procesos de control y erradicación, previamente a la reintroducción de una cabaña negativa o al realojo de animales negativos.
- d. Utilizar EPI certificados en las visitas a las granjas, junto con protocolos de uso correcto y retirada de los mismos y utilizar botas de goma desinfectadas entre granjas.
- e. Programar adecuadamente las visitas a explotaciones, de modo que tras la visita a una granja positiva pueda intercalarse una ducha y un cambio de ropa. Extremar así mismo las medidas que eviten la contaminación de vehículos, cuya descontaminación preventiva debe en cualquier caso realizarse con regularidad.
- f. Se debe incluir en los programas de control y erradicación el estudio filogenético de las cepas para un mejor conocimiento de la transmisión de la infección entre granjas, permitiendo la toma de muestras ambientales su realización incluso en localizaciones que no alberguen animales.



**CAPÍTULO 6**

**RESUMEN – RESUMO - ABSTRACT**





## **Resumen**

El virus de la enfermedad aleutiana del visón (AMDV) tiene una amplia distribución mundial e infecta principalmente al visón americano de granja y silvestre, pero también a otros mustélidos y miembros de la superfamilia *Musteloidea*. En la mayoría de los casos produce una infección persistente, cuyas consecuencias dependen del genotipo del visón y de la cepa de virus, así como del momento de la infección, el estado inmunitario, la edad del animal y la dosis y vía de la infección. En visones adultos produce una enfermedad progresiva mediada por inmunocomplejos, mientras que en crías recién nacidas y carentes de inmunidad maternal produce una neumonía intersticial aguda y generalmente fatal. Todas las cepas de campo producen la enfermedad en casi la totalidad de los individuos de genotipo aleutiano (visones azules); sin embargo, en las demás variedades el curso de la infección depende en gran medida de la virulencia de la cepa, predominando en la mayoría de los casos la infección inaparente (forma no progresiva de la enfermedad).

Dado que el AMDV causa infecciones persistentes y no se ha logrado hasta la actualidad desarrollar ninguna vacuna efectiva, el primer paso para su erradicación es la detección y eliminación de los animales infectados (“test y sacrificio”) o el sacrificio de toda la cabaña (“*stamping-out*”). Sin embargo, los programas de erradicación se ven a menudo frustrados por la reemergencia de la enfermedad, tirando por tierra los enormes esfuerzos invertidos en ellos. La incierta sensibilidad del test CIEP y la variabilidad individual en la producción de anticuerpos han sido señaladas como posibles causas del fracaso de los sistemas de erradicación. Otro factor clave a encarar en los programas de erradicación es la carga ambiental del virus en granjas infectadas, que viene asegurada por la eliminación del mismo en todos los fluidos corporales y su alta resistencia ambiental. Por consiguiente, el estudio del reservorio ambiental mediante la detección del ADN viral en las diferentes zonas y elementos de la granja es un paso importante hacia la asociación de los fómites con el riesgo de infección y resurgimiento de la enfermedad. Además, la caracterización genética de las cepas circulantes y el estudio de sus relaciones filogenéticas puede ser de gran ayuda para dilucidar su origen y las vías de entrada en la explotación.

Con estos antecedentes, los **objetivos** que se fijaron para esta tesis doctoral fueron, en primer lugar, estudiar la viabilidad de la detección del AMDV en muestras ambientales mediante qPCR en granjas con diferentes calificaciones sanitarias. A continuación, esta metodología se empleó para estudiar la distribución del virus en el ambiente de granjas infectadas y sus implicaciones epidemiológicas, sirviendo también este estudio para valorar dos métodos diferentes de extracción de ADN empleados con este tipo de muestras ambientales. En tercer lugar, se realizó una evaluación de los diferentes equipos de protección individual utilizados durante las visitas a las explotaciones de visón mediante las técnicas desarrolladas en los anteriores estudios. Por último, se realizó la caracterización molecular y el estudio filogenético de las cepas circulantes en las granjas del suroeste de Europa en el periodo 2012-2020. Los resultados obtenidos de los diferentes estudios de esta tesis se emplearon finalmente para realizar diferentes propuestas con el fin de mejorar los actuales programas de control y erradicación de la enfermedad.

En primer lugar, en el **primer estudio** se analizó la aplicación de la qPCR a la detección ambiental del AMDV en cuatro tipos de explotación de visón clasificadas en función de su estado sanitario (cinco granjas negativas sin riesgos específicos, una granja negativa recién repoblada tras finalizar un proceso de “*stamping-out*”, una granja negativa bajo un alto riesgo epidemiológico conocido de antemano y tres granjas positivas en fase de expansión epizootica de la enfermedad), utilizando un sencillo sistema de hisopado como método de muestreo para la recogida de muestras de tipo ambiental. Los resultados del estudio mostraron que todas las muestras recogidas de las cinco granjas certificadas como negativas y la granja negativa recién repoblada eran negativas a la qPCR; sin embargo, el virus pudo detectarse en el 93,9% de las muestras de las tres granjas con infección confirmada. Las muestras de la granja restante, negativa durante más de diez años pero que presentaba un riesgo conocido de infección por compartir un trabajador con una de las granjas positivas de este estudio, resultaron positivas en el 40% de los casos; en esta última granja, cabe destacar que con posterioridad a los resultados de este estudio la infección fue detectada mediante el test CIEP realizado rutinariamente dentro del programa de control de la ADSG. Entre todas las muestras positivas, el número de copias de virus detectado fluctuó entre  $6,9 \times 10^3$  y  $6,9 \times 10^7$  equivalentes genómicos/hisopo, siendo más alto en muestras de heces o de superficies en contacto directo con animales (paredes de la jaula, guantes de trabajo) y más bajo en muestras de los elementos más alejados, como las huellas de las ruedas de camión, rotaluvio, efluentes y silo. Estos resultados han representado, hasta donde sabemos, la primera demostración de contaminación ambiental por AMDV en superficies de diversa naturaleza asociadas a granjas de visón con infección confirmada o bajo un riesgo de infección alto y bien definido. Los resultados negativos obtenidos en las granjas negativas unidos al alto porcentaje de resultados positivos en las positivas demuestran la viabilidad de estudiar la contaminación ambiental por AMDV usando qPCR. Los resultados positivos muestran además que la contaminación ambiental abarca una multiplicidad de elementos, tanto en contacto directo como indirecto con los animales, que deben ser tenidos en cuenta al evaluar los riesgos y diseñar los programas de limpieza y desinfección. Los resultados positivos en la granja negativa bajo riesgo de infección, unidos a su posterior seroconversión, ilustran con claridad esta vía de contagio. Así mismo, los resultados negativos obtenidos en la granja negativa recién repoblada tras un proceso de “*stamping-out*” se vieron posteriormente validados por su evolución sanitaria, lo que sugiere que los test ambientales pueden ser utilizados para valorar el impacto de los procesos de limpieza y desinfección durante los procesos de erradicación.

El **segundo estudio** de esta tesis se centró en describir la distribución del AMDV en diferentes elementos y superficies de granjas que habían padecido un brote epizootico reciente, comparando además dos métodos diferentes de extracción del ADN a partir de las muestras ambientales recogidas. Para ello se emplearon 114 muestras ambientales recogidas en siete granjas. Las muestras se agruparon en nueve categorías diferentes en función del tipo de muestra y grado de proximidad a los animales (“Jaulas”, “Suelo/Estiércol”, “Guantes de sujeción”, “Carro de matanza”, “Dependencias”, “Efluentes”, “Periferia”, “Calle” y “Visitantes”, representando las dos últimas categorías a las personas y elementos que pueden moverse entre el resto de categorías e incluso a otras granjas). Para valorar cuál era el método



de extracción de ADN más adecuado para este tipo de muestras, se emplearon en paralelo dos métodos diferentes, siendo el primero específico para muestras de suelo (método A) y el segundo más general y adecuado para una amplia variedad de muestras (método B). En conjunto se obtuvieron un total de 97 muestras positivas (85,1%); 75 de 114 muestras resultaron positivas mediante ambos métodos, mientras que 4 muestras sólo mostraron resultados positivos mediante el método A y 18 muestras sólo mediante el método B; así, el método A detectó menos muestras positivas que el método B (69,3% y 81,6% respectivamente). En cuanto a la carga vírica detectada en las muestras, se obtuvo una mayor contaminación para las primeras categorías (en contacto directo con animales o más cerca de ellos) que en las últimas (más alejadas de los animales), siendo significativas las diferencias entre ellas en algunos de los casos según el método de extracción empleado. En cuanto al grado de concordancia entre ambos métodos para clasificar todas las muestras como positivas o negativas, se obtuvo un valor kappa de 0,49, que corresponde con un nivel de concordancia "moderado"; además, la prueba de McNemar encontró diferencias estadísticamente significativas entre las clasificaciones obtenidas por cada método. Finalmente, teniendo en cuenta las 75 muestras positivas por ambos métodos de extracción, el número de copias detectado fue significativamente mayor para el método B que para el método A. Estas discrepancias muestran la necesidad de combinar ambos métodos de extracción ante muestras de este tipo tal como se ha hecho en este estudio, permitiendo así la mejor clasificación y cuantificación posible; no obstante, como alternativa se podría emplear primero un método general de extracción como el protocolo B sobre el conjunto completo de muestras seguido de otro más específico como el protocolo A para volver a analizar aquellas muestras negativas a la primera ronda. En cuanto a las diferentes categorías, se detectó el ADN del AMDV en muestras de todas ellas independientemente del método de extracción de ADN utilizado, lo que demuestra una alta propagación del AMDV en el entorno de granjas positivas. Como cabía esperar, el número medio de copias de AMDV disminuyó con ambos protocolos desde la primera hasta la última categoría, a medida que dichas categorías se van alejando de animales. Además, el 100% de las muestras en las dos primeras categorías fueron positivas, mientras que el porcentaje de detección en las últimas fue menor, aunque también muy elevado. Estos hallazgos, junto con las diferencias significativas entre las cargas víricas recuperadas entre la primera y la última categoría, parecen indicar la existencia de un gradiente de contaminación por AMDV que disminuye desde los elementos/áreas más cercanos a los animales hasta los puntos más lejanos. De esta forma, este estudio proporciona conocimiento inédito y de gran utilidad sobre la distribución del AMDV en diferentes elementos y zonas de granjas infectadas bajo unas determinadas condiciones epidemiológicas, enriqueciendo así los conocimientos sobre su epidemiología y aportando datos objetivos en apoyo o revisión de lo que hasta ahora han sido paradigmas asumidos en base a la interpretación de datos epidemiológicos y estudios basados en la infección experimental de animales susceptibles.

El **tercer estudio** de esta tesis versó sobre la contaminación de los equipos de protección individual (EPI) durante las visitas a granjas infectadas, así como el grado de protección ofrecido por dos tipos de EPI diferentes. Este estudio se realizó en dos partes: una

aproximación preliminar en el año 2015 y un ensayo más completo en 2017 en dos granjas diferentes del mismo propietario infectadas endémicamente desde el año 2012. En ambos ensayos se evaluó la protección de dos tipos de EPI (certificados contra agentes infecciosos vs. no certificados), empleando los diferentes miembros del equipo diferentes combinaciones de los mismos durante visitas a las granjas de 30-60 minutos de duración. Para ello se recogieron muestras de los diferentes equipos y también de diversas superficies de las granjas mediante el método de muestreo empleado en los anteriores estudios y se analizaron a continuación mediante qPCR, empleando el esquema de análisis en serie propuesto en el estudio 2. En ambos ensayos todas las muestras tomadas antes de la visita fueron negativas. Después de la visita, se detectó contaminación en un total de 9/10 muestras (90%) en 2015 y 25/36 muestras (69,4%) en 2017. En general, las protecciones más externas del cuerpo y calzado se contaminaron en todos los casos, pero el grado de contaminación de los elementos cubiertos por aquellas fue variable, y en ambos casos acorde con la contaminación ambiental detectada en las granjas. Los elementos protegidos por los buzos externos no certificados se contaminaron en la mayoría de los casos, mientras que en el caso de los buzos certificados sólo hubo contaminación de los elementos internos en uno de los casos, probablemente debido a contaminación accidental en el momento de retirada de los buzos. El pelo de los visitantes protegidos por capucha no presentó contaminación, pero sí en todos los visitantes que no la utilizaron. En cuanto a la protección del calzado, las calzas externas se contaminaron en todos los casos. En el caso de los patucos internos bajo las calzas no certificadas (S) la contaminación se produjo también en todos los casos, observándose un efecto de concentración de la misma con valores más altos que en las calzas externas correspondientes y que en el propio ambiente de la granja. En cambio, en los visitantes que vestían calzas certificadas sólo se detectó contaminación en los patucos internos en uno de los casos, coincidiendo las únicas calzas externas certificadas que se perforaron durante la visita. Las muestras tomadas en las superficies de la granja para confirmar la contaminación ambiental (jaulas y suelo de las naves) resultaron positivas en todos los casos, pero entre una y dos unidades logarítmicas superior en 2015 (jaulas y suelos, respectivamente). En cuanto a la zona exterior de la granja donde se realizó la toma de muestras tras las visitas, sólo se detectó contaminación en el ensayo preliminar de 2015. Hasta donde sabemos, ésta es la primera investigación que ha empleado qPCR para evaluar la protección de diferentes EPI frente al AMDV en condiciones de campo. La cuantificación del ADN viral en los EPI fue consistente con el nivel de contaminación superficial detectado en las granjas estudiadas, sugiriendo una exposición al virus durante las visitas proporcional a la carga ambiental aún en ausencia de contacto directo con los animales. El uso de equipos EPI certificados queda así justificado por este estudio; igualmente, queda justificado el empleo de la capucha del buzo, así como de elementos de protección del calzado resistentes a rotura y perforación, siendo en este caso preferible el uso de botas de goma u otro calzado reutilizable y de fácil desinfección. Finalmente, la probable contaminación de la ropa de calle de uno de los visitantes del grupo C al finalizar la visita sugiere la necesidad de establecer protocolos precisos sobre el modo de retirada de los EPI, así como señala los riesgos de visitar una granja negativa a continuación

de una positiva, aunque se haya usado el equipo de protección adecuado, siendo también aquí necesario establecer protocolos al respecto.

En el **cuarto y último estudio** de esta tesis se realizó la caracterización molecular de las cepas de AMDV aisladas en todas las granjas infectadas en España en el periodo 2012-2020, así como de una granja de Francia y otras dos de Portugal, mediante amplificación y secuenciación de dos fragmentos del genoma del virus (genes NS1 y VP2), haciendo a continuación un estudio filogenético de las mismas para intentar establecer el origen y las vías de infección de los nuevos brotes surgidos en dicho periodo. En total se incluyeron 17 explotaciones de visón (14 de España, dos del noroeste de Portugal y una del suroeste de Francia). Todas estas granjas habían sido identificadas como infectadas mediante el test CIEP que se realiza dentro del programa de control anual. Para la realización de la parte experimental se emplearon dos tipos de muestras: bazos obtenidos de necropsias de animales CIEP positivos y muestras ambientales de diferentes elementos de las explotaciones que habían tenido contacto con animales positivos al CIEP; así, se seleccionaron 43 muestras para amplificación parcial mediante PCR convencional de los genes NS1 y VP2 y posterior secuenciación de los amplicones obtenidos. Con las secuencias resultantes se construyeron cinco árboles filogenéticos, tres de ellos únicamente con las secuencias de este estudio (NS1 y VP2 por separado y concatenadas) y dos más incluyendo otras secuencias previamente descritas en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information. Todos los árboles se construyeron mediante la aproximación Bayesiana del método de cadena de Markov-Monte Carlo, utilizando en cada caso el modelo de sustitución nucleotídica escogido mediante el Akaike Information Criterion (AIC). Todas las muestras incluidas fueron amplificadas y secuenciadas con éxito para ambos genes. Las secuencias NS1 mostraron una identidad del 83,2-100% entre sí, mientras que las secuencias VP2 oscilaron entre el 91-100% de identidad. En los casos en que se analizaron muestras de la misma granja pero de diferentes años, las secuencias obtenidas fueron prácticamente idénticas para ambos genes independientemente del año de muestreo con excepción de tres granjas en las que se obtuvieron cepas diferentes. Este es, hasta donde sabemos, el primer estudio descriptivo de las cepas de AMDV aisladas en las granjas de visón de España, Portugal y suroeste de Francia. Para ello, el trabajo se apoya no sólo en la filogenética, sino que hace uso de los conocimientos adquiridos en los tres estudios previos y también del historial serológico de las granjas y datos epidemiológicos particulares de cada una.

**En base al árbol filogenético NS1**, las secuencias del AMDV obtenidas en este estudio se dividieron en tres clados, que presentan un grado de agrupamiento geográfico imperfecto, así como lo fueron también respecto a su infecciosidad y virulencia. El clado I se subdividió en tres subclados (a, b y c), uno que comprende las cepas de tres granjas cercanas a Santiago de Compostela y la del suroeste de Francia (Ia) y otros dos que comprenden las cepas de las granjas del suroeste de Galicia y norte de Portugal (Ib y Ic). El Clado II comprende tres granjas cercanas a Madrid y una en el suroeste de Galicia situada en la zona geográfica de los clados Ib y Ic. El Clado III comprende todas las granjas cercanas a A Coruña y una cercana a las granjas del clado Ia. **El árbol filogenético para el VP2** se subdividió en cuatro clados con

un alto grado de agrupamiento geográfico, pero nuevamente más laxo en cuanto a la caracterización de infectividad y virulencia. En este nuevo árbol el Clado I sólo conserva las secuencias de tres granjas cercanas a Santiago de Compostela y las secuencias francesas, mientras el clado II sólo mantiene las tres granjas del centro del país y el clado III se mantiene intacto; sin embargo, aparece un nuevo clado (IV) que agrupa las secuencias de todas las granjas de la zona suroeste de Galicia y noroeste de Portugal. **El árbol concatenado NS1+VP2** también se dividió en cuatro clados formando grupos idénticos al árbol filogenético VP2 con algunas diferencias en la ramificación terminal. En cuanto a **la comparación con las secuencias globales** recuperadas del GenBank, las secuencias del gen NS1 pertenecientes a los clados II y III presentaron una baja homología y relaciones filogenéticas distantes con las secuencias globales previamente descritas. El clado II se agrupa con cepas de Polonia, Italia, Grecia y Suecia, mientras que en el clado III la homología fue casi total con 4 cepas previamente descritas en las granjas de ese clado, y a nivel global las cepas más cercanas fueron suecas, finlandesas y chinas, además de la cepa AMDV-K. El subclado Ia fue el que mayor grado de homología presenta respecto a las secuencias globales, agrupándose junto con cepas polacas, griegas y de los Países Bajos. Los subclados Ib y Ic formaron un subgrupo bien definido, con homologías moderadas con cepas de múltiples países, como Grecia, Polonia, Dinamarca o Países Bajos. Con respecto al gen VP2, el número de secuencias globales disponibles fue inferior que para el gen NS1, lo que dificulta su comparación con cepas de otros países. Las secuencias de los clados II y III son de nuevo las más conservadas, presentando escasa relación con las cepas de otros países, pero sí cierta relación entre ambos clados. El clado I, que se corresponde con el subclado Ia del árbol NS1, se relacionó con cepas de Polonia, Finlandia, Rusia, Bielorrusia y China. Por último, el clado IV se relacionó principalmente con cepas de Finlandia, Dinamarca, Rusia, Bielorrusia Canadá y USA. En general, los análisis filogenéticos de las cepas de este estudio mostraron una clara agrupación geográfica para los diferentes clados, tal como ha sido también descrito por otros autores. Esta agrupación de cepas no es sorprendente dado que históricamente las relaciones entre granjas han estado ligadas principalmente a cada grupo geográfico; además, el alto grado de vigilancia epidemiológica y el sistema de calificación sanitaria de las granjas españolas desde el año 2000 han evitado en gran medida el movimiento de animales infectados. El árbol filogenético construido con el fragmento del gen NS1 sólo permitió la diferenciación de los grupos principales, pero no mostró la misma resolución que el árbol VP2 y el árbol concatenado NS1+VP2, donde los clados obtenidos representan mejor las circunstancias geográficas, históricas y comerciales de las granjas. Esta mayor resolución ha sido mencionada previamente por otros autores, señalando que el análisis de fragmentos más largos o incluso de todo el genoma permite establecer las relaciones filogenéticas entre diferentes cepas con una mayor resolución.

**Finalmente**, en este estudio se discute granja a granja las características del brote o infección endémica, así como la infecciosidad y virulencia inferida para cada cepa. Para muchas de las granjas de este estudio, la filogenia muestra los orígenes y vías de infección con un grado de resolución y objetividad muy superiores a las previamente asumidas únicamente en base a datos epidemiológicos. El estudio filogenético sugiere que el origen de más de la mitad de los

brotos estuvo en la reinfección a partir de los reservorios de la propia granja, y el intercambio de material de granja y el movimiento de personas y animales fue el origen probable de los demás brotes. Cabe destacar que para uno de estos brotes la transmisión indirecta a partir de un trabajador compartido con una granja positiva quedó doblemente probado mediante a la detección ambiental y la filogenia. El caso más complejo, el de las granjas del clado IV, presenta algunas características que abren la puerta a especular sobre la posible entrada del virus desde la fauna silvestre de la zona, lo que posiblemente podrá esclarecerse cuando se disponga de secuencias procedentes de los visones silvestres de esa área. Por último, se discute también el posible origen de alguno de los brotes en el comercio internacional de material de granja, muy activo en el periodo 2012-2018.





## **Resumo**

O virus da enfermidade aleutiana do visón (AMDV) ten unha ampla distribución mundial e infecta principalmente ao visón americano de granxa e silvestre, pero tamén a outros mustélidos e membros da superfamilia *Musteloidea*. Na maioría dos casos produce unha infección persistente, cuxas consecuencias dependen do xenotipo do visón e da cepa de virus, así como do momento da infección, o estado inmunitario, a idade do animal e a dose e vía da infección. En visóns adultos produce unha enfermidade progresiva mediada por inmunocomplexos, mentres que en crías recentemente nadas e carentes de inmunidade maternal produce unha pneumonía intersticial aguda e xeralmente fatal. Todas as cepas de campo producen a enfermidade en case a totalidade dos individuos de xenotipo aleutiano (visóns azuis); con todo, nas demais variedades o curso da infección depende en gran medida da virulencia da cepa, predominando na maioría dos casos a infección inaparente (forma non progresiva da enfermidade).

Dado que o AMDV causa infeccións persistentes e non se logrou ata a actualidade desenvolver ningunha vacina efectiva, o primeiro paso para a súa erradicación é a detección e eliminación dos animais infectados (“test e sacrificio”) ou o sacrificio de toda a cabana (“*stamping-out*”). Con todo, os programas de erradicación ven a miúdo frustrados pola reemerxencia da enfermidade, tirando por terra os enormes esforzos investidos neles. A incerta sensibilidade do test CIEP e a variabilidade individual na produción de anticorpos foron sinaladas como posibles causas do fracaso dos sistemas de erradicación. Outro factor crave a encarar nos programas de erradicación é a carga ambiental do virus en granxas infectadas, que vén asegurada pola eliminación do mesmo en todos os fluídos corporais e a súa alta resistencia ambiental. Por conseguinte, o estudo do reservorio ambiental mediante a detección do ADN viral nas diferentes zonas e elementos da granxa é un paso importante cara á asociación dos fomites co risco de infección e rexurdimento da enfermidade. Ademais, a caracterización xenética das cepas circulantes e o estudo das súas relacións filoxenéticas pode ser de gran axuda para dilucidar a súa orixe e as vías de entrada na explotación.

Con estes antecedentes, os **obxectivos** que se fixaron para esta tese doutoral foron, en primeiro lugar, estudar a viabilidade da detección do en mostras ambientais mediante qPCR en granxas con diferentes cualificacións sanitarias. A continuación, esta metodoloxía empregouse para estudar a distribución do virus no ambiente de granxas infectadas e as súas implicacións epidemiolóxicas, servindo tamén este estudo para valorar dous métodos diferentes de extracción de ADN empregados neste tipo de mostras ambientais. En terceiro lugar, realizouse unha avaliación dos diferentes equipos de protección individual empregados durante as visitas das medidas de bioseguridade utilizadas durante as visitas ás explotacións de visón mediante as técnicas desenvolvidas nos anteriores estudos. Por último, realizouse a caracterización molecular e o estudo filoxenético das cepas circulantes nas granxas do suroeste de Europa no período 2012-2020. Os resultados obtidos dos diferentes estudos desta tese empregáronse finalmente para realizar diferentes propostas co fin de mellorar os actuais programas de control e erradicación da enfermidade.



En primeiro lugar, no **primeiro estudo** analizouse a aplicación da qPCR á detección ambiental do AMDV en catro tipos de explotación de visón clasificadas en función do seu estado sanitario (cinco granxas negativas sen riscos específicos, unha granxa negativa recentemente repoboada tras finalizar un proceso de “*stamping-out*”, unha granxa negativa baixo un alto risco epidemiolóxico coñecido de antemán e tres granxas positivas en fase de expansión epizóotica da enfermidade), utilizando un sinxelo sistema de hisopado como método de mostraxe para a recollida de mostras de tipo ambiental. Os resultados do estudo mostraron que todas as mostras recollidas das cinco granxas certificadas como negativas e a granxa negativa recentemente repoboada eran negativas á qPCR; con todo, o virus puido detectarse no 93,9% das mostras das tres granxas con infección confirmada. As mostras da granxa restante, negativa durante máis de dez anos pero que presentaba un risco coñecido de infección por compartir un traballador cunha das granxas positivas deste estudo, resultaron positivas no 40% dos casos; nesta última granxa, cabe destacar que con posterioridade aos resultados deste estudo a infección foi detectada mediante o test CIEP realizado rutineiramente dentro do programa de control da AD SG. Entre todas as mostras positivas, o número de copias de virus detectado oscilou entre  $6,9 \times 10^3$  e  $6,9 \times 10^7$  equivalentes xenómicos/ hisopo, sendo máis alto en mostras de feces ou de superficies en contacto directo con animais (paredes da gaiola, luvas de traballo) e máis baixo en mostras dos elementos máis afastados, como as pegadas das rodas de camión, rotaluvio, efluentes e silo. Estes resultados representaron, ata onde sabemos, a primeira demostración de contaminación ambiental por AMDV en superficies de diversa natureza asociadas a granxas de visón con infección confirmada ou baixo un risco de infección alto e ben definido. Os resultados negativos obtidos nas granxas negativas unidos á alta porcentaxe de resultados positivos nas positivas demostran a viabilidade de estudar a contaminación ambiental por AMDV usando qPCR. Os resultados positivos mostran ademais que a contaminación ambiental abarca unha multiplicidade de elementos, tanto en contacto directo como indirecto cos animais, que deben ser tidos en conta ao avaliar os riscos e deseñar os programas de limpeza e desinfección. Os resultados positivos na granxa negativa baixo risco de infección, unidos á súa posterior seroconversión, ilustran con claridade esta vía de contaxio. Así mesmo, os resultados negativos obtidos na granxa negativa recentemente repoboada tras un proceso de “*stamping-out*” víronse posteriormente validados pola súa evolución sanitaria, o que suxire que os test ambientais poden ser utilizados para valorar o impacto dos procesos de limpeza e desinfección durarache os procesos de erradicación.

O **segundo estudo** desta tese centrouse en describir a distribución do AMDV en diferentes elementos e superficies de granxas que padeceran un gromo epizóotico recente, comparando ademais dous métodos diferentes de extracción do ADN a partir das mostras ambientais recollidas. Para iso empregáronse 114 mostras ambientais recollidas en sete granxas. As mostras agrupáronse en nove categorías diferentes en función do tipo de mostra e grao de proximidade aos animais (“Gaiolas”, “Chan/Esterco”, “Luvas de suxeición”, “Carro de matanza”, “Dependencias”, “Efluentes”, “Periferia”, “Rúa” e “Visitantes”, representando as dúas últimas categorías ás persoas e elementos que poden moverse entre o resto de categorías e mesmo a outras granxas). Para valorar cal era o método de extracción de ADN máis

adequado para este tipo de mostras, empregáronse en paralelo dous métodos diferentes, sendo o primeiro específico para mostras de chan (método A) e o segundo máis xeral e adecuado para unha ampla variedade de mostras (método B). En conxunto obtivéronse un total de 97 mostras positivas (85,1%); 75 de 114 mostras resultaron positivas mediante ambos os métodos, mentres que 4 mostras só mostraron resultados positivos mediante o método A e 18 mostras só mediante o método B; así, o método para detectou menos mostras positivas que o método B (69,3% e 81,6% respectivamente). En canto á carga vírica detectada nas mostras, obtívose unha maior contaminación para as primeiras categorías (en contacto directo con animais ou máis preto deles) que nas últimas (máis afastadas dos animais), sendo significativas as diferenzas entre elas nalgúns dos casos segundo o método de extracción empregado. En canto ao grao de concordancia entre ambos os métodos para clasificar todas as mostras como positivas ou negativas, obtívose un valor kappa de 0,49, que corresponde cun nivel de concordancia "moderado"; ademais, a proba de McNemar atopou diferenzas estatisticamente significativas entre as clasificacións obtidas por cada método. Finalmente, tendo en conta as 75 mostras positivas por ambos os métodos de extracción, o número de copias detectado foi significativamente maior para o método B que para o método A. Estas discrepancias mostran a necesidade de combinar ambos os métodos de extracción ante mostras deste tipo tal como fíxose neste estudo, permitindo así a mellor clasificación e cuantificación posible; con todo, como alternativa poderíase empregar primeiro un método xeral de extracción como o protocolo B sobre o conxunto completo de mostras seguido doutro máis específico como o protocolo A para volver analizar aquelas mostras negativas á primeira rolda. En canto ás diferentes categorías, detectouse o ADN do AMDV en mostras de todas elas independentemente do método de extracción de ADN utilizado, o que demostra unha alta propagación do AMDV na contorna de granxas positivas. Como cabía esperar, o número medio de copias de AMDV diminuíu con ambos os protocolos desde a primeira ata a última categoría, a medida que ditas categorías vanse afastando de animais. Ademais, o 100% das mostras nas dúas primeiras categorías foron positivas, mentres que a porcentaxe de detección nas últimas foi menor, aínda que tamén moi elevado. Estes achados, xunto coas diferenzas significativas entre as cargas víricas recuperadas entre a primeira e a última categoría, parecen indicar a existencia dun gradiente de contaminación por AMDV que diminúe desde os elementos/áreas máis próximos aos animais ata os puntos máis afastados. Desta forma, este estudo proporciona coñecemento inédito e de gran utilidade sobre a distribución do AMDV en diferentes elementos e zonas de granxas infectadas baixo unhas determinadas condicións epidemiolóxicas, enriquecendo así os coñecementos sobre a súa epidemioloxía e achegando datos obxectivos en apoio ou revisión do que ata o de agora foron paradigmas asumidos en base á interpretación de datos epidemiolóxicos e estudos baseados na infección experimental de animais susceptibles.

O **terceiro estudo** desta tese versou sobre a contaminación dos equipos de protección individual (EPI) durante as visitas a granxas infectadas, así como o grao de protección ofrecido por dous tipos de EPI diferentes. Este estudo realizouse en dous partes: unha aproximación preliminar no ano 2015 e un ensaio máis completo en 2017 en dúas granxas diferentes do mesmo propietario infectadas endémicamente desde o ano 2012. En ambos os

ensaio avaliouse a protección de dous tipos de EPI (certificados contra axentes infecciosos vs. non certificados), empregando os diferentes membros do equipo diferentes combinacións dos mesmos durante visitas ás granxas de 30-60 minutos de duración. Para iso recolléronse mostras dos diferentes equipos e tamén de diversas superficies das granxas mediante o método de mostraxe empregada nos anteriores estudos e analizáronse a continuación mediante qPCR, empregando o esquema de análise en serie proposto no estudo 2. En ambos os ensaios todas as mostras tomadas antes da visita foron negativas. Despois da visita, detectouse contaminación nun total de 9/10 mostras (90%) en 2015 e 25/36 mostras (69,4%) en 2017. En xeral, as proteccións máis externas do corpo e calzado contamináronse en todos os casos, pero o grao de contaminación dos elementos cubertos por aquelas foi variable, e en ambos os casos acorde coa contaminación ambiental detectada nas granxas. Os elementos protexidos polos monos externos non certificados contamináronse na maioría dos casos, mentres que no caso dos monos certificados só houbo contaminación dos elementos internos nun dos casos, probablemente debido a contaminación accidental no momento de retirada dos monos. O pelo dos visitantes protexidos por carapucha non presentou contaminación, pero si en todos os visitantes que non a utilizaron. En canto á protección do calzado, as calzas externas contamináronse en todos os casos. No caso dos patucos internos baixo as calzas non certificadas (S) a contaminación produciuse tamén en todos os casos, observándose un efecto de concentración da mesma con valores máis altos que nas calzas externas correspondentes e que no propio ambiente da granxa. En cambio, nos visitantes que vestían calzas certificadas só se detectou contaminación nos patucos internos nun dos casos, coincidindo as únicas calzas externas certificadas que se perforaron durante a visita. As mostras tomadas nas superficies da granxa para confirmar a contaminación ambiental (gaiolas e chan das naves) resultaron positivas en todos os casos, pero entre unha e dúas unidades logarítmicas superior en 2015 (gaiolas e chans, respectivamente). En canto á zona exterior da granxa onde se realizou a toma de mostras tras as visitas, só se detectou contaminación no ensaio preliminar de 2015. Ata onde sabemos, esta é a primeira investigación que empregou qPCR para avaliar a protección de diferentes EPI fronte ao AMDV en condicións de campo. A cuantificación do ADN viral nos EPI foi consistente co nivel de contaminación superficial detectado nas granxas estudadas, suxerindo unha exposición ao virus durante as visitas proporcional á carga ambiental aínda en ausencia de contacto directo cos animais. O uso de equipos EPI certificados queda así xustificado por este estudo; igualmente, queda xustificado o emprego da carapucha do mono, así como de elementos de protección do calzado resistentes a rotura e perforación, sendo neste caso preferible o uso de botas de goma ou outro calzado reutilizable e de fácil desinfección. Finalmente, a probable contaminación da roupa de rúa dun dos visitantes do grupo C ao finalizar a visita suxire a necesidade de establecer protocolos precisos sobre o modo de retirada dos EPI, así como sinala os riscos de visitar unha granxa negativa a continuación dunha positiva, aínda que se usou o equipo de protección adecuado, sendo tamén aquí necesario establecer protocolos respecto diso.

No **cuarto e último estudo** desta tese realizouse a caracterización molecular das cepas de AMDV illadas en todas as granxas infectadas en España no período 2012-2020, así como dunha granxa de Francia e outras dúas de Portugal, mediante amplificación e secuenciación

de dous fragmentos do xenoma do virus (xenes NS1 e VP2), facendo a continuación un estudo filoxenético das mesmas para tentar establecer a orixe e as vías de infección dos novos gromos xurdidos no devandito período. En total incluíronse 17 explotacións de visón (14 de España, dous do noroeste de Portugal e unha do suroeste de Francia). Todas estas granxas foran identificadas como infectadas mediante o test CIEP que se realiza dentro do programa de control anual. Para a realización da parte experimental empregáronse dous tipos de mostras: bazos obtidos de necropsias de animais CIEP positivos e mostras ambientais de diferentes elementos das explotacións que tiveran contacto con animais positivos ao CIEP; así, seleccionáronse 43 mostras para amplificación parcial mediante PCR convencional dos xenes NS1 e VP2 e posterior secuenciación dos amplicóns obtidos. Coas secuencias resultantes construíronse cinco árbores filoxenéticas, tres delas unicamente coas secuencias deste estudo (NS1 e VP2 por separado e concatenadas) e dúas máis incluíndo outras secuencias previamente descritas na base de datos GenBank do National Center for Biotechnology Information. Todas as árbores construíronse mediante a aproximación Bayesiana do método de cadea de Markov-Monte Carlo, utilizando en cada caso o modelo de substitución nucleotídica escollido mediante o Akaike Information Criterion (AIC). Todas as mostras incluídas foron amplificadas e secuenciadas con éxito para ambos os xenes. As secuencias NS1 mostraron unha identidade do 83,2-100% entre si, mentres que as secuencias VP2 oscilaron entre o 91-100% de identidade. Nos casos en que se analizaron mostras da mesma granxa pero de diferentes anos, as secuencias obtidas foron practicamente idénticas para ambos os xenes independentemente do ano de mostraxe con excepción de tres granxas nas que se obtiveron cepas diferentes. Este é, ata onde sabemos, o primeiro estudo descritivo das cepas de AMDV illadas nas granxas de visón de España, Portugal e suroeste de Francia. Para iso, o traballo apóiase non só na filoxenética, senón que fai uso dos coñecementos adquiridos nos tres estudos previos e tamén do historial serolóxico das granxas e datos epidemiolóxicos particulares de cada unha.

**En base á árbore filoxenética NS1**, as secuencias do AMDV obtidas neste estudo dividíronse en tres clados, que presentan grao de agrupamento xeográfico imperfecto, así como fórono tamén respecto a súa infecciosidade e virulencia. O clado I subdividiuse en tres subclados (a, b e c), un que comprende as cepas de tres granxas próximas a Santiago de Compostela e a do suroeste de Francia (Ia) e outros dous que comprenden as cepas das granxas do suroeste de Galicia e norte de Portugal (Ib e Ic). O Clado II comprende tres granxas próximas a Madrid e unha no suroeste de Galicia situada na zona xeográfica dos clados Ib e Ic. O Clado III comprende todas as granxas próximas a A Coruña e unha próxima ás granxas do clado Ia. **A árbore filoxenética para o VP2** subdividiuse en catro clados cun alto grao de agrupamento xeográfico, pero novamente máis laxo en canto á caracterización de infectividade e virulencia. Nesta nova árbore o Clado I só conserva as secuencias de tres granxas próximas a Santiago de Compostela e as secuencias francesas, mentres o clado II só mantén as tres granxas do centro do país e o clado III mantense intacto; con todo, aparece un novo clado (IV) que agrupa as secuencias de todas as granxas da zona suroeste de Galicia e noroeste de Portugal. **A árbore concatenada NS1+VP2** tamén se dividiu en catro clados formando grupos idénticos á árbore filoxenética VP2 con algunhas diferenzas na ramificación



terminal. En canto á **comparación coas secuencias globais** recuperadas do GenBank, as secuencias do xene NS1 pertencentes aos clados II e III presentaron unha baixa homoloxía e relacións filoxenéticas distantes coas secuencias globais previamente descritas. O clado II agrúpase con cepas de Polonia, Italia, Grecia e Suecia, mentres que no clado III a homoloxía foi case total con 4 cepas previamente descritas nas granxas dese clado, e a nivel global as cepas máis próximas foron suecas, finlandesas e chinesas, ademais da cepa AMDV-K. O subclado Ia foi o que maior grao de homoloxía presenta respecto ás secuencias globais, agrupándose xunto con cepas polacas, gregas e dos Países Baixos. Os subclados Ib e Ic formaron un subgrupo ben definido, con homoloxías moderadas con cepas de múltiples países, como Grecia, Polonia, Dinamarca ou Países Baixos. Con respecto ao xene VP2, o número de secuencias globais dispoñibles foi inferior que para o xene NS1, o que dificulta a súa comparación con cepas doutros países. As secuencias dos clados II e III son de novo as máis conservadas, presentando escasa relación coas cepas doutros países, pero si certa relación entre ambos os clados. O clado I, que se corresponde co subclado Ia da árbore NS1, relacionouse con cepas de Polonia, Finlandia, Rusia, Bielorrusia e China. Por último, o clado IV relacionouse principalmente con cepas de Finlandia, Dinamarca, Rusia, Bielorrusia Canadá e USA. En xeral, as análises filoxenéticas das cepas deste estudo mostraron unha clara agrupación xeográfica para os diferentes clados, tal como foi tamén descrito por outros autores. Esta agrupación de cepas non é sorprendente dado que historicamente as relacións entre granxas estiveron ligadas principalmente a cada grupo xeográfico; ademais, o alto grao de vixilancia epidemiolóxica e o sistema de cualificación sanitaria das granxas españolas desde o ano 2000 evitaron en gran medida o movemento de animais infectados. A árbore filoxenética construída co fragmento do xene NS1 só permitiu a diferenciación dos grupos principais, pero non mostrou a mesma resolución que a árbore VP2 e a árbore concatenada NS1+VP2, onde os clados obtidos representan mellor as circunstancias xeográficas, históricas e comerciais das granxas. Esta maior resolución foi mencionada previamente por outros autores, sinalando que a análise de fragmentos máis longos ou mesmo de todo o xenoma permite establecer as relacións filoxenéticas entre diferentes cepas cunha maior resolución.

**Finalmente**, neste estudo discútense granxa a granxa as características do gromo ou infección endémica, así como a infecciosidade e virulencia inferida para cada cepa. Para moitas das granxas deste estudo, a filoxenia mostra as orixes e vías de infección cun grao de resolución e obxectividade moi superiores ás previamente asumidas unicamente en base a datos epidemiolóxicos. O estudo filoxenético suxire que a orixe de máis da metade dos gromos estivo na reinfección a partir dos reservorios da propia granxa, e o intercambio de material de granxa e o movemento de persoas e animais foi a orixe probable dos demais gromos. Cabe destacar que para un destes gromos a transmisión indirecta a partir dun traballador compartido cunha granxa positiva quedou dobremente probado mediante á detección ambiental e a filoxenia. O caso máis complexo, o das granxas do clado IV, presenta algunhas características que abren a porta para especular sobre a posible entrada do virus desde a fauna silvestre da zona, o que posiblemente poderá esclarecerse cando se dispoña de secuencias procedentes dos visóns silvestres desa área. Por último, discútense tamén a posible orixe dalgún dos gromos no comercio internacional de material de granxa, moi activo no período 2012-2018.

## **Abstract**

Aleutian Mink Disease Virus (AMDV) has a worldwide distribution and infects mainly the American farmed and wild mink, but also other mustelids and members of the *Musteloidea* superfamily. In most cases, it produces a persistent infection; the consequences of this infection depend on the genotype of mink, the strain of virus, the time of infection, the immune status of the animal as well as the dose and route of infection. In adult mink, it produces a progressive disease mediated by immune complexes; however, in newborn kits lacking maternal immunity it produces acute and generally fatal interstitial pneumonia. All field strains cause disease in almost all Aleutian genotypes (blue mink); however, in other varieties, the course of infection depends to a great extent on the virulence of the strain with inapparent infection (nonprogressive form of the disease) predominant in most cases.

Given that AMDV causes persistent infections and no effective vaccine has been developed to date, the first step for its eradication is the detection and elimination of infected animals (“test and removal”) or culling the entire herd (“stamping-out”). Eradication programs are often frustrated by the reemergence of disease, undermining the enormous investments in them. The uncertain sensitivity of the CIEP test and individual variability in antibody production have been pointed out as possible causes for the failure of eradication systems. Another key factor to address in eradication programs is the environmental burden of the virus on infected farms, which is ensured by the viral excretion in all body fluids and its high environmental resistance. Therefore, the study of the environmental reservoir by detecting the viral DNA in different zones and elements of the farm is an important step towards the association of fomites with the risk of infection and resurgence of the disease. Furthermore, the genetic characterization of circulating strains and the study of their phylogenetic relationships can be of great help in identifying their origin and the routes of entry into the farms.

With this background, the **objectives** that were set for this doctoral thesis were, in the first place, to study the feasibility of the detection of AMDV in environmental samples by means of qPCR in farms with different sanitary qualifications. This methodology was then used to study the distribution of the virus in the environment of infected farms and its epidemiological implications, serving also to assess two different DNA extraction methods used in this type of environmental samples. In third place, an evaluation of the different protective personal equipment employed during visits to mink farms was carried out using the techniques developed in previous studies. Finally, the molecular characterization and the phylogenetic study of the circulating strains in the farms of southwestern Europe in the period 2012-2020 were carried out. The results obtained from the different studies in this thesis were finally used to make different proposals in order to improve the current disease control and eradication programs.

In **the first study** of this thesis, the application of qPCR to the environmental detection of AMDV was analyzed in four types of mink farms classified according to their health status (five negative farms without specific risks, one negative farm recently repopulated after finishing a process of “stamping-out”, one negative farm under a high epidemiological risk



known in advance and three positive farms in a phase of epizootic expansion of the disease). This assay was done by using a simple swabbing system as a sampling method for collecting environmental samples. The results of the study showed that all samples collected from the five certified negative farms and those from the newly repopulated negative farm were negative for qPCR; however, the virus was detected in 93.9% of the samples from the three farms with confirmed infection. Samples from the remaining farm (negative for more than ten years but with a known risk of infection due to share a worker with one of the positive farms in this study), were positive in 40% of the cases. In this last farm, it should be noted that after this study was completed, infection was detected by the CIEP test performed routinely within the AD SG control program. Among all positive samples, the number of copies of virus detected fluctuated between  $6.9 \times 10^3$  and  $6.9 \times 10^7$  genomic equivalents/swab, being higher in stool samples or from surfaces in direct contact with animals (cage walls, work gloves) and lower in samples furthest from the animals, such as truck wheels, wheel dips, effluents and silos. These results have represented, to the best of our knowledge, the first demonstration of environmental contamination by AMDV on diverse surfaces associated with mink farms with confirmed infection or with a high and well-defined risk of infection. The negative results obtained in the negative farms, together with the high percentage of positive results from the positive ones, demonstrate the feasibility of studying the environmental contamination by AMDV using qPCR. The positive results also show that environmental contamination encompasses a multiplicity of elements, both in direct and indirect contact with animals, which must be taken into account when assessing risks and designing cleaning and disinfection programs. The positive results in the negative farm at high risk of infection, together with its subsequent seroconversion, clearly illustrate this route of infection. Likewise, the negative results obtained in the newly repopulated negative farm after a “stamping-out” process, were subsequently validated by its health evolution, which suggests that environmental tests can be used to assess the impact of the cleaning and disinfection processes during the eradication procedure.

The **second study** of this thesis was focused on describing the distribution of AMDV on different elements and surfaces of farms that had suffered a recent epizootic outbreak, also comparing two different methods of DNA extraction from collected environmental samples. One hundred fourteen environmental samples collected from seven farms were used for this. The samples were grouped into nine different categories according to the type of sample and degree of proximity to the animals. The categories were as follows: “Cages”, “Soil/Manure”, “Catching gloves”, “Slaughter box”, “Facilities”, “Effluents”, “Periphery”, “Street” and “Visitors”. The last two categories represent people and elements that can move between the rest of the categories and even to other farms. To assess which was the most appropriate DNA extraction method for these types of samples, two different methods were used in parallel, the first being specific for soil samples (method A) and the second being more general and suitable for a wide variety of samples (method B). Altogether, a total of 97 positive samples (85.1%) were obtained, with 75 out of 114 samples being positive by both methods, while four samples only showed positive results by method A and 18 samples only by method B. Thus, method A detected fewer positive samples than method B (69.3% and 81.6%

respectively). Regarding the viral load detected in the samples, a greater contamination was obtained for the first categories (in direct contact with animals or closer to them) than in the last ones (further away from the animals), with the differences between them being significant in some cases according to the extraction method used. To assess the degree of agreement between both methods to classify all samples as positive or negative, a kappa value of 0.49 was obtained, which corresponds to a "moderate" level of agreement. Furthermore, the McNemar test found statistically significant differences between the classifications obtained by each method. Finally, taking into account the 75 positive samples by both extraction methods, the number of copies detected was significantly higher for method B than for method A. These discrepancies show the need to combine both extraction methods for this kind of samples such as it has been done in this study, thus allowing the best possible classification and quantification. However, as an alternative, a general extraction method such as protocol B on the complete set of samples could be used first, followed by a more specific method such as protocol A to re-analyze those negative samples in the first round. Regarding the different categories, AMDV DNA was detected in samples from all of them, regardless of the DNA extraction method used. This shows a high spread of AMDV in the environment of positive farms. As expected, the mean number of copies of AMDV decreased with both protocols from the first to the last category as these categories move away from animals. Furthermore, 100% of the samples in the first two categories were positive, while the percentage of detection in the latter categories was lower, although also very high. These findings, together with the significant differences between the viral loads recovered between the first and last categories, seem to indicate the existence of a gradient of contamination by AMDV that decreases from the elements/areas closest to the animals to the most distant points. In this way, this study provides unpublished and very useful knowledge on the distribution of AMDV in different elements and areas of infected farms under certain epidemiological conditions. This enriches the knowledge about the epidemiology by providing objective data in support or revision of what, until now, have been paradigms assumed on the base of interpretation of epidemiological data and studies done by experimental infection of susceptible animals.

The **third study** of this thesis dealt with the contamination of personal protective equipment (PPE) during visits to infected farms, as well as the degree of protection offered by two different types of PPE. This study was carried out in two parts, a preliminary approach in 2015 and a more complete trial in 2017 on two different farms of the same owner, endemically infected since 2012. Both trials utilized the protection of two types of PPE (certified against infectious agents vs. non-certified), with different team members using different combinations of these PPE during visits to farms of 30-60 minutes in duration. The following procedure was used: samples were collected from the different PPE and also from various surfaces of the farms by the sampling method used in the previous studies and were subsequently analyzed by qPCR using the serial analysis scheme proposed in study two. In both parts of the study, all samples taken before the visit were negative. After the visit, contamination was detected in a total of 9/10 samples (90%) in 2015 and 25/36 samples (69.4%) in 2017. In general, the external protections of the body and footwear were

contaminated in all cases, but the degree of contamination of the elements covered by them was variable, and in both cases this was consistent with the environmental contamination detected on the farms. The items protected by non-certified external coveralls were contaminated in most cases, while in the case of certified coveralls there was only internal item contamination in one case, probably due to accidental contamination at the time of coverall removal. The hair of the visitors protected by the hood did not show contamination, whereas it did so in all the visitors who did not use it. Regarding the protection of footwear, the external bootcovers were contaminated in all cases. In the case of the internal protections (shoe covers) under the non-certified bootcovers (S), contamination also occurred in all cases, observing a concentration of it with higher values than on the corresponding external bootcovers or on the environment of the farm. On the other hand, for the visitors who wore certified bootcovers, contamination was only detected in the internal protection in one of the cases, coinciding with the only certified bootcover that was perforated during the visit. Samples taken from farm surfaces to confirm environmental contamination (the cages and the sheds' floor), were positive in all cases but were between one and two log units higher in 2015 (cages and shed floor, respectively). Regarding the area outside the farm where samples were taken after visits, contamination was only detected in the preliminary test in 2015. To the best of our knowledge, this is the first investigation that has used qPCR to evaluate the protection of different PPE against AMDV under field conditions. The quantification of the viral DNA in the PPE was consistent with the level of surface contamination detected in the farms studied. This suggests an exposure to the virus during visits proportional to the environmental load even in the absence of direct contact with the animals. The use of certified PPE equipment is thus justified by this study; likewise, the use of the coverall's hood is justified, as well as elements to protect the footwear which were resistant to breakage and perforation. In this case, it is preferable to use rubber boots or another reusable footwear that are easily disinfected. Finally, the probable contamination of the street clothes of one of the visitors from group C at the end of the visit suggests the need to establish precise protocols on how to remove PPE, and also points out the risks of visiting a negative farm after visiting a positive one, even if the appropriate protective equipment has been used, and therefore it is also necessary to establish protocols in this regard.

In the **fourth and last study** of this thesis, the molecular characterization of the isolated AMDV strains from all the infected farms in Spain during the period 2012-2020, as well as from a farm in France and two in Portugal, were carried out by means of amplification and sequencing of two fragments of the virus genome (NS1 and VP2 genes). In addition, this was followed by a phylogenetic study trying to establish the origin and routes of infection of the new outbreaks that had emerged in that period. In total, seventeen mink farms were included (fourteen from Spain, two from northwestern Portugal and one from southwestern France). All these farms had been identified as infected through the CIEP testing that is carried out within the annual control program. Two types of samples were used to carry out the experimental part: spleens obtained from necropsies of CIEP positive animals and environmental samples from different elements of the farms which had contact with CIEP positive animals. Thus, 43 samples were selected for partial amplification of the NS1 and VP2

genes by conventional PCR and the subsequent sequencing of the obtained amplicons. With the resulting sequences, five phylogenetic trees were constructed, three of them only with the sequences of this study (NS1 and VP2 separately and concatenated) and two more including other sequences previously described in the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information. All the trees were constructed using the Bayesian approach of the Markov-Monte Carlo chain method, using in each case the nucleotide substitution model chosen by the Akaike Information Criterion (AIC). All included samples were successfully amplified and sequenced for both genes. The NS1 sequences showed 83.2-100% identity to each other, while the VP2 sequences ranged from 91-100% identity. In those cases where samples from the same farm but from different years were analyzed, the sequences obtained were practically identical for both genes regardless of the sampling year, except for three farms in which different strains were obtained. This is, as far as we know, the first descriptive study of AMDV strains isolated from mink farms in Spain, Portugal and south-western France. For this, the work relies not only on phylogenetics, but also makes use of the knowledge acquired in three previous studies, the serological history of the farms and epidemiological data particular to each one.

Based on the **NS1 phylogenetic tree**, the AMDV sequences obtained in this study were divided into three clades, representing an imperfect geographic grouping as well as regarding the infectivity and virulence inside each group. Clade I was subdivided into three subclades (a, b, and c), one comprising the strains from three farms near Santiago de Compostela and also the one from south-western France (Ia), and two comprising strains from farms in southwestern Galicia and north of Portugal (Ib and Ic). Clade II comprises three farms near Madrid and one in the southwest of Galicia, located in the geographical area of clades Ib and Ic. Clade III includes all the farms near A Coruña and one close to the farms in clade Ia. The **phylogenetic tree for VP2** were subdivided into four clades with a high degree of geographic clustering, but again more relaxed in terms of infectivity and virulence. In this new tree, Clade I only contains the sequences from three farms near Santiago de Compostela and the French sequences, while clade II only contains the three farms in the center of the country, and Clade III remains intact; however, a new clade (IV) appears grouping the sequences of all the farms in the southwest of Galicia and northwest of Portugal. The **concatenated tree NS1 + VP2** is also divided into four clades forming groups identical to the phylogenetic tree VP2 with some differences in terminal branching. Regarding the **comparison with the global sequences** recovered from GenBank, the sequences of the NS1 gene belonging to clades II and III presented low homology and distant phylogenetic relationships with the previously described global sequences. Clade II is grouped with strains from Poland, Italy, Greece and Sweden, while in clade III the homology was almost identical to the four strains previously described from the farms of that clade, being the closest strains Swedish, Finnish and Chinese, in addition to the AMDV-K strain. Subclade Ia was the one with the highest degree of homology with regard to the global sequences and grouped together with Polish, Greek and Dutch strains. The subclades Ib and Ic formed a well-defined subgroup, with moderate homologies with strains from multiple countries, such as Greece, Poland, Denmark or the Netherlands. With respect to the VP2 gene, the number of global sequences available was lower than for

the NS1 gene, reducing the resolution when comparing the Spanish strains with those from other countries. The sequences of clades II and III are again the most conserved, showing little relationship with the strains from other countries, but there is a certain relationship between both clades. Clade I, which corresponds to subclade Ia of the NS1 tree, was related to strains from Poland, Finland, Russia, Belarus and China. Finally, clade IV was mainly related to strains from Finland, Denmark, Russia, Belarus, Canada and the USA. In general, the phylogenetic analysis of the strains of this study showed a clear geographical grouping for the different clades, as has also been described by other authors. This grouping of strains is not surprising given that historically the relationships between farms have been mainly linked to each geographic group; furthermore, the high degree of epidemiological surveillance and the sanitary qualification system of Spanish farms since 2000 have largely prevented the movement of infected animals. The phylogenetic tree built with the NS1 gene fragment only allowed the differentiation of the main groups but did not show the same resolution as the VP2 tree and the concatenated NS1 + VP2 tree, where the clades better represent the geographical, historical and commercial circumstances of the farms. This higher resolution has been previously mentioned by other authors, pointing out that the analysis of longer fragments or even the entire genome allows for establishing phylogenetic relationships between different strains with higher resolution.

**Finally**, in this study the characteristics of the outbreak or endemic infection are discussed farm by farm, as well as the infectivity and inferred virulence for each strain. For many of the farms in this study, the phylogeny shows the origins and routes of infection with a much higher degree of resolution and objectivity than previously assumed solely based on epidemiological data. The phylogenetic study suggests that the origin of more than half of the outbreaks was in the reinfection from the reservoirs of the farm itself, while the exchange of farm material and the movement of people and animals was the probable origin of the other outbreaks. It should be noted that for one of these outbreaks, the indirect transmission from a shared worker with a positive farm was doubly proven by environmental detection and phylogeny. The most complex case, the farms from clade IV, presents some characteristics that open the door to speculate about the possible entry of the virus from the wild fauna of the area, which may possibly be clarified if sequences from the feral mink of that area become available. Finally, we also discuss the possible origin of some of the outbreaks in the international trade of farm material, which was very active in the 2012-2018 period.







**CAPÍTULO 7**

**BIBLIOGRAFÍA**





- Aasted, B., 1980. Purification and Characterization of Aleutian Disease Virus. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B Microbiol.* 88 B, 323-328.
- Aasted, B., 1985. Aleutian disease of mink. *Virology and immunology. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. Suppl.* 198, 1-47.
- Aasted, B., 1989. Mink infected with aleutian disease virus have an elevated level of CD8-positive T-lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 20, 375-385.
- Aasted, B., 2000. Mink Plasmocytosis Vaccines, en: Bloom, M.E. (Ed.), *Proceedings of the VIIIth International Scientific Congress in Fur Animal Production.* Scientifur, Kastoria, 12-15.
- Aasted, B., Cohn, A., 1982. Inhibition of Precipitation in Counter Current Electrophoresis. A Sensitive Method for Detection of Mink Antibodies To Aleutian Disease Virus. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Ser. C Immunol.* 90C, 15-19.
- Aasted, B., Hauch, H., 1988. Studies on the progression of Aleutian disease in mink. *Acta Vet. Scand.* 29, 315-21.
- Aasted, B., Avery, B., Cohn, A., 1984a. Serological analyses of different mink Aleutian disease virus strains. *Arch. Virol.* 80, 11-22.
- Aasted, B., Race, R.E., Bloom, M.E., 1984b. Aleutian disease virus, a parvovirus, is proteolytically degraded during in vivo infection in mink. *J. Virol.* 51, 7-13.
- Aasted, B., Alexandersen, S., Cohn, A., Hansen, M., 1986. Counter current line absorption immunoelectrophoresis in an alternative diagnostic screening test to counter current immunoelectrophoresis in Aleutian disease (AD) eradication programs. *Acta Vet. Scand.* 27, 410-420.
- Aasted, B., Alexandersen, S., Christensen, J., 1998. Vaccination with aleutian mink disease parvovirus (AMDV) capsid proteins enhances disease, while vaccination with the major non-structural AMDV protein causes partial protection from disease. *Vaccine* 16, 1158-1165.
- Abbaszadegan, M., Huber, M.S., Gerba, C.P., Pepper, I.L., 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1318-1324.
- Abramov, A. V, 1999. A taxonomic review of the genus *Mustela* (*Mammalia, Carnivora*). *Zoosyst Ross.* 8, 357-364.
- Ahmed, W., Harwood, V., Gyawali, P., Sidhu, J., Toze, S., 2015. Comparison of concentration methods for quantitative detection of sewage-associated viral markers in environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2042-2049.

- Alex, C.E., Kubiski, S. V., Li, L., Sadeghi, M., Wack, R.F., McCarthy, M.A., Pesavento, J.B., Delwart, E., Pesavento, P.A., 2018. *Amdoparvovirus* Infection in Red Pandas (*Ailurus fulgens*). Vet. Pathol. 55, 552-561.
- Alexandersen, S., 1986. Acute Interstitial Pneumonia in Mink Kits: Experimental Reproduction of the Disease. Vet. Pathol. 23, 579-588.
- Alexandersen, S., 1990. Studies on the Pathogenesis of Disease Caused by Aleutian Mink Disease Parvovirus. APMIS. Suppl. 14, 1-32.
- Alexandersen, S., Hau, J., 1985. Rocket line immunoelectrophoresis: an improved assay for simultaneous quantification of a mink parvovirus (Aleutian Disease Virus) antigen and antibody. J. Virol. 10, 145-151.
- Alexandersen, S., Bloom, M.E., 1987. Studies on the sequential development of acute interstitial pneumonia caused by Aleutian disease virus in mink kits. J. Virol. 61, 81-6.
- Alexandersen, S., Hau, J., Aasted, B., Poulsen, O.M., 1985a. Thin-layer counter current line absorption immunoelectrophoretic analysis of antigens and antibodies to Aleutian disease virus - a mink parvovirus. Electrophoresis 6, 535-538.
- Alexandersen, S., Uttenthal-Jensen, A., Hansen, M., Aasted, B., 1985b. Experimental Transmission of Aleutian Disease virus (ADV) to Different Animal Species. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Ser. B Microbiol. 93 B, 195-200.
- Alexandersen, S., Bloom, M.E., Wolfinbarger, J., Race, R.E., 1987. In situ molecular hybridization for detection of Aleutian mink disease parvovirus DNA by using strand-specific probes: identification of target cells for viral replication in cell cultures and in mink kits with virus-induced interstitial pneumonia. J. Virol. 61, 2407-2419.
- Alexandersen, S., Bloom, M.E., Wolfinbarger, J., 1988. Evidence of restricted viral replication in adult mink infected with Aleutian disease of mink parvovirus. J. Virol. 62, 1495-507.
- Alexandersen, S., Larsen, S., Cohn, A., Uttenthal, A., Race, R.E., Aasted, B., Hansen, M., Bloom, M.E., 1989. Passive transfer of antiviral antibodies restricts replication of Aleutian mink disease parvovirus in vivo. J. Virol. 63, 9-17.
- Alexandersen, S., Larsen, S., Aasted, B., Uttenthal, A., Hansen, M., Bloom, M.E., 1994a. Acute Interstitial Pneumonia in Mink Kits Inoculated with Defined Isolates of Aleutian Mink Disease Parvovirus. Vet. Pathol. 31, 216-228.
- Alexandersen, S., Storgaard, T., Kamstrup, N., Aasted, B., Porter, D.D., 1994b. Pathogenesis of Aleutian mink disease parvovirus infection: effects of suppression of antibody response on viral mRNA levels and on development of acute disease. J. Virol. 68, 738-49.

- Alonso, C., Goede, D.P., Morrison, R.B., Davies, P.R., Rovira, A., Marthaler, D.G., Torremorell, M., 2014. Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Vet. Res.* 45 (73).
- Allerson, M.W., Cardona, C.J., Torremorell, M., 2013. Indirect Transmission of Influenza A Virus between Pig Populations under Two Different Biosecurity Settings. *PLoS One* 8(6): e67293.
- An, S.H., Ingram, D.G., 1977. Detection of Inapparent Aleutian Disease Virus Infection in Mink. *WSU, Department of Veterinary Microbiology and Immunology*.
- An, S.H., Ingram, D.G., 1978. Transmission of Aleutian disease from mink with inapparent infections. *Am. J. Vet. Res.* 39, 309–313.
- An, S.H., Wilkie, B.N., 1981. Mitogen- and viral antigen-induced transformation of lymphocytes from normal mink and from mink with progressive or nonprogressive Aleutian disease. *Infect. Immun.* 34, 111-114.
- An, S.H., Depauli, F.J., Wright, P., Ingram, D.G., 1978. Characteristics of inapparent Aleutian disease virus infection in mink. *Res. Vet. Sci.* 24, 200-204.
- Andersson, A.M., 2017. Endemic Aleutian Disease. A strategy for diagnosis and control. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
- Andersson, A.M., Wallgren, P., 2013. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of Aleutian mink disease virus infection in mink. *Acta Vet. Scand.* 55, 1-6.
- Andersson, A.M., Reineck, H.B., Nyman, A.K., Wallgren, P., 2015. Quantitative detection of antibodies to Aleutian disease virus in dried blood spots as an estimation of hypergammaglobulinemia in mink. *Virol. Mycol.* 4.
- Andersson, A.M., Nyman, A.K., Wallgren, P., 2017. A retrospective cohort study estimating the individual Aleutian disease progress in female mink using a VP2 ELISA and its association to reproductive performance. *Prev. Vet. Med.* 140, 60-66.
- Anistoroaei, R., Krogh, A.K., Christensen, K., 2013. A frameshift mutation in the *LYST* gene is responsible for the Aleutian color and the associated Chédiak-Higashi syndrome in American mink. *Anim. Genet.* 44, 178-183.
- Best, S.M., Bloom, M.E., 2006. Aleutian mink disease parvovirus, en: Kerr, J.R., Cotmore, S.F., Bloom, M.E., Linden, R.M., Parris, C.R. (Eds.), *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, 457-471.

- Best, S.M., Shelton, J.F., Pompey, J.M., Wolfinbarger, J.B., Bloom, M.E., 2003. Caspase cleavage of the nonstructural protein NS1 mediates replication of Aleutian mink disease parvovirus. *J. Virol.* 77, 5305-5312.
- Bloom, M.E., Race, R.E., Hadlow, W.J., Chesebro, B., 1975. Aleutian disease of mink: the antibody response of sapphire and pastel mink to Aleutian disease virus. *J. Immunol.* 115, 1034-1037.
- Bloom, M.E., Race, R.E., Wolfinbarger, J.B., 1980. Characterization of Aleutian disease virus as a parvovirus. *J. Virol.* 35, 836-843.
- Bloom, M.E., Race, R.E., Wolfinbarger, J.B., 1982. Identification of a Nonvirion Protein of Aleutian Disease Virus : Mink with Aleutian Disease Have Antibody to Both Virion and Nonvirion Proteins. *J. Virol.* 43, 608-616.
- Bloom, M.E., Race, R.E., Wolfinbarger, J.B., 1987. Analysis of Aleutian disease of mink parvovirus infection using strand-specific hybridization probes. *Intervirology* 27, 102-111.
- Bloom, M.E., Alexandersen, S., Perryman, S., Lechner, D., Wolfinbarger, J.B., 1988. Nucleotide sequence and genomic organization of Aleutian mink disease parvovirus (ADV): sequence comparisons between a nonpathogenic and a pathogenic strain of ADV. *J. Virol.* 62, 2903-15.
- Bloom, M.E., Kanno, H.K., Mori, S., Wolfinbarger, B., 1994. Aleutian Mink Disease: Puzzles and Paradigms. *Infect. Agents Dis.* 3, 279-301.
- Bloom, M.E., Oie, K.L., Wolfinbarger, J., Christensen, P., Durrant, G., 1997. Evaluation of the polymerase chain reaction (PCR) as a tool for diagnosing infections with the Aleutian mink disease parvovirus (ADV). *Scientifur* 21, 141-146.
- Bloom, M.E., Best, S.M., Hayes, S.F., Wells, R.D., Wolfinbarger, J.B., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M., 2001. Identification of aleutian mink disease parvovirus capsid sequences mediating antibody-dependent enhancement of infection, virus neutralization, and immune complex formation. *J. Virol.* 75, 11116-27.
- Boone, S.A., Gerba, C.P., 2005. The occurrence of influenza A virus on household and day care center fomites. *J. Infect.* 51, 103-109.
- Bosch, A., 1998. Human enteric viruses in the water environment: A minireview. *Int. Microbiol.* 1, 191-196.
- Boschetti, N., Wyss, K., Mischler, A., Hostettler, T., Kempf, C., 2003. Stability of minute virus of mice against temperature and sodium hydroxide. *Biologicals* 31, 181-185.



- Bowman, J., Kidd, A.G., Nituch, L. a, Sadowski, C., Schulte-Hostedde, A.I., 2014. Testing for aleutian mink disease virus in the river otter (*Lontra canadensis*) in sympatry with infected American mink (*Neovison vison*). J. Wildl. Dis. 50, 689-693.
- Brennan, M.L., Christley, R.M., 2012. Biosecurity on Cattle Farms: A Study in North-West England. PLoS One 7(1): e28139.
- Britton, A.P., Redford, T., Bidulka, J.J., Scouras, A.P., Sojonky, K.R., Zabek, E., Schwantje, H., Joseph, T., 2017. Beyond Rabies: Are Free-Ranging Skunks (*Mephitis mephitis*) in British Columbia Reservoirs of Emerging Infection? Transbound. Emerg. Dis. 64, 603-612.
- Broll, S., Alexandersen, S., 1996. Investigation of the pathogenesis of transplacental transmission of Aleutian mink disease parvovirus in experimentally infected mink. J. Virol. 70, 1455-1466.
- Burger, D., Gorham, J.R., Leader, R.W., 1965. Some physical and chemical characteristics of partially purified Aleutian disease virus. NINBD Monogr. No 2, Slow, Latent Temp. Virus Infect. 307-313.
- Cancel-Tirado, S.M., Yoon, K.-J., 2003. Antibody-Dependent Enhancement of Virus Infection and Disease. Viral Immunol. 16, 69-86.
- Canuti, M., Whitney, H.G., Lang, A.S., 2015. Amdoparvoviruses in small mammals: Expanding our understanding of parvovirus diversity, distribution, and pathology. Front. Microbiol. 6, 1-9.
- Canuti, M., O'Leary, K.E., Hunter, D.B., Spearman, G., Ojkic, D., Whitney, H.G., Lang, A.S., 2016. Driving forces behind the evolution of the Aleutian mink disease parvovirus in the context of intensive farming. Virus Evol. 2.
- Canuti, M., Doyle, H.E., Britton, A.P., Lang, A.S., 2017. Full genetic characterization and epidemiology of a novel amdoparvovirus in striped skunk (*Mephitis mephitis*). Emerg. Microbes Infect. 6.
- Canuti, M., Todd, M., Monteiro, P., Van Osch, K., Weir, R., Schwantje, H., Britton, A.P., Lang, A.S., 2020. Ecology and infection dynamics of multi-host amdoparvoviral and protoparvoviral carnivore pathogens. Pathogens 9.
- Casal, J., De Manuel, A., Mateu, E., Martín, M., 2007. Biosecurity measures on swine farms in Spain: Perceptions by farmers and their relationship to current on-farm measures. Prev. Vet. Med. 82, 138-150.
- Casanova, L., Rutala, W.A., Weber, D.J., Sobsey, M.D., 2009. Methods for the recovery of a model virus from healthcare personal protective equipment. J. Appl. Microbiol. 106, 1244-1251.

- Castelruiz, Y., Blixenkrone-Møller, M., Aasted, B., 2005. DNA vaccination with the Aleutian mink disease virus NS1 gene confers partial protection against disease. *Vaccine* 23, 1225-1231.
- Centers for Disease Control and Prevention 2019. Protecting Healthcare Personnel.
- Cepica, A., 2016. Canadian experience with MALDI-TOF profiling of plasma proteins in selection for breeding for Aleutian disease resistance, and comparison to iodine precipitation and AMDV-Ab ELISA, en: Mäki-Tanila, A., Valaja, J., Manonen, J., Sironen, T. and Vapalahti, O. (Ed.), *Proceedings of the XIth International Scientific Congress in Fur Animal Production. Scientifur* 40(3/4)., Helsinki, 107-116.
- Cepica, A., Iwamoto, T., 2012. Field evaluation of CIEP and PCR detection/removal control methods of Aleutian disease (AD) in Canada, en: Larsen, P.F., Møller, S.H., Clausen, T., Hammer, A.S., Lásen, T.M., Nielsen, V.H., Tauson, A.H., Jeppesen, L.L., Hansen, S.W., Elnif, J., Malmkvist, J. (Ed.), *Proceedings of the Xth International Scientific Congress in Fur Animal Production. Scientifur* 36 (3/4). Wageningen Academic Publishers, 196-205.
- Cepica, A., Zargar, A., Mohamed, B., Iwamoto, I., 2012. In vivo MALDI-TOF markers for early detection of Aleutian disease (AD) among the AD virus infected minke, en: Larsen, P.F., Møller, S.H., Clausen, T., Hammer, A.S., Lásen, T.M., Nielsen, V.H., Tauson, A.H., Jeppesen, L.L., Hansen, S.W., Elnif, J., Malmkvist, J. (Ed.), *Proceedings of the Xth International Scientific Congress in Fur Animal Production. Scientifur* 36 (3/4). Wageningen Academic Publishers, 134-145.
- Clemens, D.L., Wolfenbarger, J.B., Mori, S., Berry, B.D., Hayes, S.F., Bloom, M.E., 1992. Expression of Aleutian mink disease parvovirus capsid proteins by a recombinant vaccinia virus: self-assembly of capsid proteins into particles. *J. Virol.* 66, 3077-3085.
- Colenutt, C., Gonzales, J.L., Paton, D.J., Gloster, J., Nelson, N., Sanders, C., 2016. Aerosol transmission of foot-and-mouth disease virus Asia-1 under experimental conditions. *Vet. Microbiol.* 189, 39-45.
- Corzo, C.A., Culhane, M., Dee, S., Morrison, R.B., Torremorell, M., 2013. Airborne Detection and Quantification of Swine Influenza A Virus in Air Samples Collected Inside, Outside and Downwind from Swine Barns. *PLoS One* 8(8): e71444.
- Corzo, C.A., Allerson, M., Gramer, M., Morrison, R.B., Torremorell, M., 2014. Detection of airborne influenza a virus in experimentally infected pigs with maternally derived antibodies. *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 28-36.
- Costa, J., 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22, 299-305.

- Cotmore, S.F., Tattersall, P., 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* 33, 91-174.
- Cotmore, S.F., Tattersall, P., 2014. Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple. *Annu. Rev. Virol.* 1, 517-537.
- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., Davison, A.J., 2014. The family *Parvoviridae*. *Arch. Virol.* 159, 1239-1247.
- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Canuti, M., Chiorini, J.A., Eis-Hubinger, A.-M., Hughes, J., Mietzsch, M., Modha, S., Ogliastro, M., Péntzes, J.J., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Consortium, I.R., 2019. ICTV virus taxonomy profile: *Parvoviridae*. *J. Gen. Virol.* 100, 367-368.
- Crawford, T.B., McGuire, T.C., Porter, D.D., Cho, H.J., 1977. A comparative study of detection methods for Aleutian disease viral antibody. *J. Immunol.* 118, 1249-1251.
- Chapman, I., Jimenez, F.A., 1963. Aleutian-Mink Disease in Man. *N. Engl. J. Med.* 269, 1171-1174.
- Cheema, a, Henson, J.B., Gorham, J.R., 1972. Aleutian disease of mink. Prevention of lesions by immunosuppression. *Am. J. Pathol.* 66, 543-56.
- Cheng, F., Chen, A.Y., Best, S.M., Bloom, M.E., Pintel, D., Qiu, J., 2010. The Capsid Proteins of Aleutian Mink Disease Virus Activate Caspases and Are Specifically Cleaved during Infection. *J. Virol.* 84, 2687-2696.
- Cho, D.G., Ingram, H.J., 1972. Antigen and Antibody in Aleutian Disease in Mink. I. Precipitation Reaction by Agar-Gel Electrophoresis. *J Immunol* 108, 555-557.
- Cho, H.J., Ingram, D.G., 1973. Antigen and antibody in Aleutian disease in mink. II. The reaction of antibody with the Aleutian disease agent using immunodiffusion and immunoelectroosmophoresis. *Can. J. Comp. Med. Rev. Can. médecine Comp.* 37, 217-223.
- Cho, H.J., Ingram, D.G., 1974. The antigen and virus of Aleutian disease in mink. *J. Immunol. Methods* 4, 217-228.
- Cho, H.J., Greenfield, J., 1978. Eradication of aleutian disease of mink by eliminating positive counterimmunoelectrophoresis test reactors. *J. Clin. Microbiol.* 7, 18-22.
- Chriél, M., 2000a. Impact of outbreaks of acute Aleutian disease in Danish Mink farms. *Scientifur* 24, 16-20.

- Chriél, M., 2000b. Interpretation of Test Results in Eradication Programmes Using Multiple Sampling, en: Proceedings of the 9th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics. 1997-1999.
- Christensen, J., Pedersen, M., Aasted, B., Aexandersen, S., 1995. Purification and Characterization of the Major Nonstructural Protein (NS-1) of Aleutian Mink Disease Parvovirus. Microbiology 69, 1802-1809.
- Christensen, L.S., Gram-Hansen, L., Chriél, M., Jensen, T.H., 2011. Diversity and stability of Aleutian mink disease virus during bottleneck transitions resulting from eradication in domestic mink in Denmark. Vet. Microbiol. 149, 64-71.
- Dam-Tuxen, R., Dahl, J., Jensen, T.H., Dam-Tuxen, T., Struve, T., Bruun, L., 2014. Diagnosing Aleutian mink disease infection by a new fully automated ELISA or by counter current immunoelectrophoresis: A comparison of sensitivity and specificity. J. Virol. Methods 199, 53-60.
- Daoust, P.Y., Hunter, D.B., 1978. Spontaneous Aleutian disease in ferrets. Can. Vet. J. 19, 133-135.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. Nat. Methods 9, 772.
- Davies, R.H., Wray, C., 1996. Determination of an effective sampling regime to detect salmonella enteritidis in the environment of poultry units. Vet. Microbiol. 50, 117-127.
- De Geus, B., Van Eck, J., Van de Louw, A., Van Willigen, F.K., Bokhout, B., 1996. Transmission of Aleutian disease virus by air. Scientifur 20, 350-354.
- Dee, S., Otake, S., Oliveira, S., Deen, J., 2009. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Mycoplasma hyopneumoniae. Vet. Res. 40.
- Deeney, A., 2002. Aleutian disease in ferrets [WWW Document]. Infect. Immun. URL <http://www.nfws.uk/archive/aleutian01.htm> (accedido 10.4.19).
- Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J., 2003. A decade of caspases. Oncogene 22, 8543-8567.
- Desai, R., 2016. Association between nine Immune System Gene Polymorphisms and Tolerance to Aleutian Mink Disease Virus Infection. Doctoral thesis. Dalhousie University Halifax, Nova Scotia.
- Donat, K., Kube, J., Dressel, J., Einax, E., Pfeffer, M., Failing, K., 2015. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in environmental samples by faecal culture and real-time PCR in relation to apparent within-herd prevalence as determined by individual faecal culture. Epidemiol. Infect. 143, 975-985.

- Duffy, S., Shackelton, L.A., Holmes, E.C., 2008. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat. Rev. Genet.* 9, 267-76.
- Dyer, N.W., Ching, B., Bloom, M.E., 2000. Nonsuppurative meningoencephalitis associated with Aleutian mink disease parvovirus infection in ranch mink. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 12, 159-162.
- Eklund, C.M., Hadlow, W.J., Kennedy, R.C., Boyle, C.C., Jackson, T.A., 1968. Aleutian disease of mink: Properties of the etiologic agent and the host responses. *J. Infect. Dis.* 118, 510-526.
- Ellis, L.C., 1996. Melatonin reduces mortality from Aleutian disease in mink (*Mustela vison*). *J. Pineal Res.* 21, 214-217.
- Espregueira Themudo, G., Østergaard, J., Ersbøll, A.K., 2011. Persistent spatial clusters of plasmacytosis among Danish mink farms. *Prev. Vet. Med.* 102, 75-82.
- Espregueira Themudo, G., Houe, H., Agger, J.F., Østergaard, J., Ersbøll, A.K., 2012. Identification of biosecurity measures and spatial variables as potential risk factors for Aleutian disease in Danish mink farms. *Prev. Vet. Med.* 107, 134-141.
- Eterpi, M., McDonnell, G., Thomas, V., 2009. Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J. Hosp. Infect.* 73, 64-70.
- European Commission, 2007. A new Animal Health Strategy for the European Union (2007-2013) where “Prevention is better than cure”. Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. Office for Official Publications of the European Communities.
- European Commission, 2016. Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council of 9 March 2016 on transmissible animal diseases and amending and repealing certain acts in the area of animal health (“Animal Health Law”). *Off. J. Eur. Union* 208.
- Fan, Z., Zhang, H., Rong, M., Meng, D., Yu, Z., Jiang, L., Jiang, P., 2019. Molecular cloning and bioinformatics analysis of dqa gene from mink (*Neovison vison*). *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Farid, A., 2010. Selection For Low Blood Gamma Globulin In Mink Naturally Exposed To The Aleutian Mink Disease Virus, en: 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Leipzig, Germany.
- Farid, A.H., 2013. Aleutian mink disease virus in furbearing mammals in Nova Scotia, Canada. *Acta Vet. Scand.* 55.

- Farid, A.H., 2018. Dynamics of Aleutian Mink Disease Virus on a Farm Under Test and Removal Scheme. *J. Vet. Sci. Med. Diagn.* 7.
- Farid, A.H., Ferns, L.E., 2011. Aleutian mink virus infection may cause hair depigmentation. *Scientifur* 35, 55-59.
- Farid, A.H., Hussain, I., 2019. A comparison between intraperitoneal injection and intranasal and oral inoculation of mink with Aleutian mink disease virus. *Res. Vet. Sci.* 124, 85-92.
- Farid, A.H., Hussain, I., 2020. Dose response of black American mink to Aleutian mink disease virus. *Immunity, Inflamm. Dis.*
- Farid, A.H., Rupasinghe, P., Mitchell, J.L., Rouvinen-Watt, K., 2010. A survey of Aleutian mink disease virus infection of feral American mink in Nova Scotia. *Can. Vet. J.* 51, 75-77.
- Farid, A.H., Zillig, M.L., Finley, G.G., Smith, G.C., 2012. Prevalence of the Aleutian mink disease virus infection in Nova Scotia, Canada. *Prev. Vet. Med.* 106, 332-338.
- Farid, A.H., Gardner, K., Butler, L.F., Rupasinghe, P.P., Myles, S., 2014. Genome-wide Association Mapping of Response to Infection by the Aleutian Mink Disease Virus, en: *Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production.*
- Farid, A.H., Hussain, I., Arju, I., 2015. Detection of Aleutian mink disease virus DNA and antiviral antibodies in American mink (*Neovison vison*) 10 days postinoculation. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 27, 287-294.
- Favero, M.S., McDade, J.J., Robertsen, J.A., Hoffman, R.K., Edwards, R.W., 1968. Microbiological Sampling of Surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* 31, 336-343.
- Fernández-Antonio, R., Prieto, A., Díaz-Cao, J.M., López, G., Panadero, R., Díaz, P., Morrondo, P., Fernández, G., 2016. Study of distribution of AMDV load in infected mink farms environment, en: Mäki-Tanila, A., Valaja, J., Manonen, J., Sironen, T., O., V. (Eds.), *Proceedings of the XIth International Scientific Congress in Fur Animal Production.* *Scientifur* 40, 75-80.
- Fournier-Chambrillon, C., Aasted, B., Perrot, A., Pontier, D., Sauvage, F., Artois, M., Cassiède, J.-M., Chauby, X., Dal Molin, A., Simon, C., Fournier, P., 2004. Antibodies To Aleutian Mink Disease Parvovirus in Free-Ranging European Mink (*Mustela Lutreola*) and Other Small Carnivores From Southwestern France. *J. Wildl. Dis.* 40, 394-402.
- FurCommission, U., 2011. A rainbow of choices [WWW Document]. <https://furcommission.com/true-colors/>. Acceso el 23de diciembre 2018. URL <https://furcommission.com/true-colors/>.



- Gallimore, C.I., Taylor, C., Gennery, A.R., Cant, A.J., Galloway, A., Xerry, J., Adigwe, J., Gray, J.J., 2008. Contamination of the hospital environment with gastroenteric viruses: Comparison of two pediatric wards over a winter season. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3112-3115.
- Ganime, A., Leite, J., de Abreu Corrêa, A., Melgaço, F., Carvalho-Costa, F., Miagostovich, M., 2015. Evaluation of the swab sampling method to recover viruses from fomites. *J. Virol. Methods* 217, 24-27.
- García-Mata, R., 1990. El visón. Su cría en cautividad. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Gardner, I., 2017. Epidemiology and Control of Viral Diseases, en: MacLachlan, N.J., Dubovi, E.J. (Ed.), *Fenner's Veterinary Virology*. Academic Press, Londres, Reino Unido, 131-153.
- Girones, R., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Corrêa, A., Hundesa, A., Carratala, A., Bofill-Mas, S., 2010. Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* 44, 4325-4339.
- Glueckert, E., Clifford, D.L., Brenn-White, M., Ochoa, J., Gabriel, M., Wengert, G., Foley, J., 2019. Endemic Skunk amdoparvovirus in free-ranging striped skunks (*Mephitis mephitis*) in California. *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 2252-2263.
- Gorham, J.R., 2000. Perspectives on Aleutian disease, en: Bloom, M.E. (Ed.), *Proceedings of the VIIth International Scientific Congress in Fur Animal Production*. Kastoria, Macedonia, Greece. Vol V: Recent Progress in Aleutian Disease Research. *Scientifur* 24, 3-6.
- Gorham, J.R., Shen, D.T., 1981. Aleutian Disease of Mink. *Infect. Dis. Wild Mamm.* 154, 1016-1032.
- Gorham, J.R., Leader, R.W., Henson, J.B., 1964. The experimental transmission of a virus causing hypergammaglobulinemia in mink: sources and modes of infection. *Washingt. Agric. Exp. Stn. Sci. Pap.* 2439, 341-345.
- Gorham, J.R., Leader, R.W., Padgett, G.A., Burger, D., Henson, J.B., 1965. Some Observations of the Natural Occurrence of Aleutian Disease, en: Gajdousek D., Carleton G., Gibbs C.J.Jr., and A.M. (Ed.), *Slow, latent, and temperate virus infections*. NINDB Monograph No. 2. U.S.P.H.S. Publ. No. 1378, 279-285.
- Gorham, J.R., Henson, J.B., Padgett, G.A., McGuire, T.C., 1970a. Aleutian Disease Of Mink. *Infectious Diseases of Wild Mammals*, 140-152
- Gorham, J.R., Henson, J.R., Padgett, G.A., 1970b. Aleutian Mink-A Sentinal Animal For Aleutian Disease In Dark Mink. Washington Satate University, Pullman.

- Gorham, J.R., Henson, J.B., Crawford, T.B., Padgett, G.A., 1976. The epizootiology of aleutian disease. Slow virus diseases of animals and man. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Gottschalck, E., Alexandersen, S., Cohn, A., Poulsen, L.A., Bloom, M.E., Aasted, B., 1991. Nucleotide sequence analysis of Aleutian mink disease parvovirus shows that multiple virus types are present in infected mink. *J. Virol.* 65, 4378-4386.
- Gottschalck, E., Alexandersen, S., Storgaard, T., Bloom, M.E., Aasted, B., 1994. Sequence comparison of the non-structural genes of four different types of Aleutian mink disease parvovirus indicates an unusual degree of variability. *Arch. Virol.* 138, 213-231.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696-704.
- Gunnarsson, E., 2001. Documenting freedom from disease and re-establishing a free status after a breakdown Aleutian Disease (Plasmacytosis) in farmed mink in Iceland. *Acta Vet. Scand.*, suppl. 94, 87-87.
- Haagsma, J., 1969. Epizootiology of Aleutian disease (plasmacytosis) in mink. *Neth. J. vet. Sci.* 2, 19-31.
- Haagsma, J., 1984. Contribution to the Control of Aleutian Disease, en: 3rd Internat. Congress in Fur Animal Production.
- Haagsma, J., Bokhout, B.A., 1980. Contribution to the Epidemiology and Eradication of Aleutian disease, en: 2nd Internat. Congress in Fur Animal Production.
- Haas, L., Wohlsein, P., Trautwein, G., Stolze, B., Kaaden, O. -R, 1990. Violet Mink Develop an Acute Disease after Experimental Infection with Aleutian Disease Virus (ADV) Isolate ADV SL3. *J. Vet. Med. Ser. B* 37, 106-117.
- Hadlow, W.J., 1982. Ocular Lesions in Mink Affected with Aleutian Disease. *Vet. Pathol.* 19, 5-15.
- Hadlow, W.J., Race, R.E., Kennedy, R.C., 1983. Comparative pathogenicity of four strains of Aleutian disease virus for pastel and sapphire mink. *Infect. Immun.* 41, 1016-1023.
- Hadlow, W.J., Race, R.E., Kennedy, R.C., 1984. Royal pastel mink respond variously to inoculation with Aleutian disease virus of low virulence. *J Virol* 50, 38-41.
- Hadlow, W.J., Race, R.E., Kennedy, R.C., 1985. Temporal replication of the Pullman strain of Aleutian disease virus in royal pastel mink. *J. Virol.* 55, 853-6.

- Hagberg, E.E., Krarup, A., Fahnøe, U., Larsen, L.E., Dam-Tuxen, R., Pedersen, A.G., 2016. A fast and robust method for whole genome sequencing of the Aleutian Mink Disease Virus (AMDV) genome. *J. Virol. Methods* 234, 43-51.
- Hagberg, E.E., Pedersen, A.G., Larsen, L.E., Krarup, A., 2017. Evolutionary analysis of whole-genome sequences confirms inter-farm transmission of Aleutian mink disease virus. *J. Gen. Virol.* 98, 1360-1371.
- Hahn, E.C., 1984. Immune complexes in Aleutian disease: demonstration of antibody on isolated virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 5, 313-321.
- Hahn, E.C., Hahn, P.S., 1983. Autoimmunity in Aleutian disease: Contribution of antiviral and anti-DNA antibody to hypergammaglobulinemia. *Infect. Immun.* 41, 494-500.
- Hahn, E.C., Ramos, L., Kenyon, A.J., 1977. Properties of Aleutian disease virus assayed with feline kidney cells. *Arch. Virol.* 55, 315-326.
- Häkli, K., Helsingin, M., Laitos Kotieläinten, M., 2013. Genetic parameters of minks Aleutian Disease infection and fertility traits. University of Helsinki.
- Hall, T.A., 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Hammer, A.S., Dietz, H.H., Hamilton-Dutoit, S., 2007. Immunohistochemical detection of 3 viral infections in paraffin-embedded tissue from mink (*Mustela vison*): A tissue-microarray-based study. *Can. J. Vet. Res.* 71, 8-13.
- Hansen, M., 1980. Eradication of Aleutian Disease by Means of CEP-Test, en: 2nd Internat. Congress in Fur Animal Production. Denmark.
- Hansen, M., 1985. Diseases and hygiene of mink, en: Joergensen, G. (Ed.), Mink Production. Scientifur, 261-340.
- Hansen, M., 1988. The Results of ten Years Eradication of Aleutian Disease in Denmark, en: Proceedings of the IVth International Scientific Congress in Fur Animal Production. 219-225.
- Hansen, M., Lund, E., 1988. Pregnancy rate and foetal mortality in Aleutian disease virus infected mink. *Acta Vet. Scand* 29, 271-272.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Ohgaki, S., 2010. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water Res.* 44, 1747-1752.
- Hartby, C.M., Jensen, T.H., Larsen, K.S., Hansen, M.S., Chriél, M., Larsen, L.E., Struve, T., Hjulsgaard, C.K., 2015a. Transmission of Aleutian Mink Disease Virus with fleas. *Scientifur* 40, 19-19.

- Hartby, C.M., Jensen, T.H., Larsen, K.S., Hanser, M.S., 2015b. Transmission of Aleutian Mink Disease Virus with fleas, Annual Report 2015, 95-99. Kopenhagen Research. Aarhus N, Denmark.
- Hartsough, G.R., Gorham, J.R., 1956. Aleutian Disease of Mink. *Natl. Fur News* 28, 10-11.
- Helmboldt, C.F., Jungherr, E.L., 1958. The pathology of Aleutian disease in mink. *Am. Jour. Vet. Res.* 19, 212-222.
- Helmbolt, C.F., Kenyon, A.J., Dessel, B.H., 1965. The comparative aspects of Aleutian mink disease (AD), en: Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., Alpers, M.P. (Eds.), *Slow, latent, and temperate virus infections*. US Department of Health, Education and Welfare, Washington, D.C., 315-319.
- Henson, J.B., Leader, R.W., Gorham, J.R., 1961. Hypergammaglobulinemia in mink. *Proc Soc Exp Biol Med.* 919-920.
- Henson, J.B., Gorham, J.R., Leader, R.W., 1962a. A field test for Aleutian disease. *Natl. Fur News*.
- Henson, J.B., Gorham, J.R., Leader, R.W., Wagner, B.M., 1962b. Experimental hypergammaglobulinemia in mink. *J. Exp. Med.* 116, 357-364.
- Henson, J.B., Leader, R.W., Gorham, J.R., 1962c. Hypergammaglobulinemia in mink. *Olympic Rep.* February, 11-12.
- Henson, J.B., Gorham, J.R., Leader, R.W., 1963a. The Familial Occurrence of Hypergammaglobulinemia in Mink. *Tex. Rep. Biol. Med.* 21, 1-8.
- Henson, J.B., Gorham, R.J., Leader, R.W., 1963b. Hypergammaglobulinæmia in Mink initiated by a Cell-free Filtrate. *Nature* 197, 206-207.
- Henson, J.B., Leader, R.W., Gorham, J.R., Padgett, G.A., 1966a. The Sequential Development of Lesions in Spontaneous Aleutian Disease of Mink. *Vet. Pathol.* 3, 289-314.
- Henson, J.B., Padgett, G.A., Gorham, J.R., 1966b. The Early history of Aleutian Disease. *Natl. Fur News*, 21-24.
- Henson, J.B., Gorham, J.R., McGuire, T.C., Crawford, T.B., 1976. Pathology and pathogenesis of Aleutian disease, en: Kimberlin, R.H. (Ed.), *Slow virus diseases of animals and man*. North Holland Publishing Co. Amsterdam, 175-205.
- Hietala, S.K., Hullinger, P.J., Crossley, B.M., Kinde, H., Ardans, A.A., 2005. Environmental air sampling to detect exotic Newcastle disease virus in two California commercial poultry flocks. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 17, 198-200.

- Huang, Q., Luo, Y., Cheng, F., Best, S.M., Bloom, M.E., Qiu, J., 2014. Molecular characterization of the small nonstructural proteins of parvovirus Aleutian mink disease virus (AMDV) during infection. *Virology* 452-453, 23-31.
- Huggett, J.F., Novak, T., Garson, J.A., Green, C., Morris-Jones, S.D., Miller, R.F., Zumla, A., 2008. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: An important and unrecognised phenomenon. *BMC Res. Notes* 1.
- Hunter, D.B., 2008. Review of factors associated with mink kit mortality, en: Benkel, B., Farid, H., Hunter, D.B., Murphy, B., Rouvinen-Wat, K. and Harris, L. (Ed.), *Proceedings of the IX International Scientific Congress in Fur Animal Production*. Halifax. Scientifur, vol. 32, 28-29.
- Hussain, I., Price, G.W., Farid, A.H., 2014. Inactivation of aleutian mink disease virus through high temperature exposure in vitro and under field-based composting conditions. *Vet. Microbiol.* 173, 50-58.
- ICTV, 2018a. Genus: *Amdoparvovirus*. [WWW Document]. Int. Comm. Taxon. Viruses. 2018b Taxon. Release MSL#34. URL [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/ssdna-viruses/w/parvoviridae/1039/genus-amdoparvovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/parvoviridae/1039/genus-amdoparvovirus) (accedido 3.25.19).
- ICTV, 2018b. *Parvoviridae* [WWW Document]. Int. Comm. Taxon. Viruses. 2018b Taxon. Release MSL#34. URL [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/ssdna-viruses/w/parvoviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/parvoviridae) (accedido 3.30.19).
- Ijzerman, M.M., Dahling, D.R., Fout, G.S., 1997. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 63, 145-153.
- Ingram, D.G., Cho, H.J., 1974. Aleutian disease in mink: virology, immunology and pathogenesis. *J. Rheumatol.* 1, 74-92.
- Jackson, M.K., Ellis, L.C., Morrey, J.D., Barnard, D., 1992. Early detection of Aleutian disease virus in mink by polymerase chain reaction. *Norw J Agric Sci* 9, 385–387.
- Jackson, M.K., Ellis, L.C., Morrey, J.D., Li, Z.Z., Bernard, D.I., 1996a. Progression of Aleutian disease in natural and experimentally induced infections of mink. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1753-1758.
- Jackson, M.K., Winslow, S.G., Dockery, L.D., Jones, J.K., Sisson, D.V., 1996b. Investigation of an outbreak of Aleutian disease on a commercial mink ranch. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1706-1710.
- Jahns, H., Daly, P., McElroy, M.C., Sammin, D.J., Bassett, H.F., Callanan, J.J., 2010. Neuropathologic features of Aleutian disease in farmed mink in Ireland and molecular

- characterization of Aleutian mink disease virus detected in brain tissues. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22, 101-105.
- Jakubczak, A., Kowalczyk, M., Kostro, K., Jezewska-Witkowska, G., 2017. Comparative molecular analysis of strains of the aleutian disease virus isolated from farmed and wild mink. *Ann. Agric. Environ. Med.* 24, 366-371.
- Jensen, P. V, Castelruiz, Y., Aasted, B., 2003. Cytokine profiles in adult mink infected with Aleutian mink disease parvovirus. *J. Virol.* 77, 7444-51.
- Jensen, T.H., Christensen, L.S., Chriél, M., Uttenthal, Å., Hammer, A.S., 2011. Implementation and validation of a sensitive PCR detection method in the eradication campaign against Aleutian mink disease virus. *J. Virol. Methods* 171, 81-85.
- Jensen, T.H., Christensen, L.S., Chriél, M., Harslund, J., Salomonsen, C.M., Hammer, A.S., 2012. High prevalence of Aleutian mink disease virus in free-ranging mink on a remote Danish island. *J. Wildl. Dis.* 48, 497-502.
- Jensen, T.H., Hammer, A.S., Chriél, M., 2014. Monitoring chronic infection with a field strain of Aleutian mink disease virus. *Vet. Microbiol.* 168, 420-427.
- Jensen, T.H., Chriél, M., Hansen, M.S., 2016. Progression of experimental chronic Aleutian mink disease virus infection. *Acta Vet. Scand.* 58, 18-20.
- Jeong, M.I., Park, S.Y., Ha, S. Do, 2017. Thermal inactivation of human norovirus on spinach using propidium or ethidium monoazide combined with real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Food Control* 78, 79-84.
- Jepsen, J.R., D'Amore, F., Baandrup, U., Clausen, M.R., Gottschalck, E., Aasted, B., 2009. Aleutian Mink Disease Virus and Humans. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 2040-2042.
- Jericho, K.W., 1982. Intrapulmonary lymphoid tissue in mink infected with Aleutian disease virus. *Res. Vet. Sci.* 32, 206-212.
- Joergensen, G., 1985. Mink Production. Scientifur.
- Jones, D.R., Anderson, K.E., Guard, J.Y., 2012. Prevalence of coliforms, *Salmonella*, *Listeria*, and *Campylobacter* associated with eggs and the environment of conventional cage and free-range egg production. *Poult. Sci.* 91, 1195-1202.
- Julian, T.R., Tamayo, F.J., Leckie, J.O., Boehm, A.B., 2011. Comparison of surface sampling methods for virus recovery from fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6918-6925.
- Julian, T.R., Schwab, K.J., 2012. Challenges in environmental detection of human viral pathogens. *Curr. Opin. Virol.* 2, 78-83.



- Kanno, H., Wolfinbarger, J.B., Bloom, M.E., 1992. Identification of Aleutian mink disease parvovirus transcripts in macrophages of infected adult mink. *J. Virol.* 66, 5305-5312.
- Kanno, H., Wolfinbarger, J.B., Bloom, M.E., 1993a. Aleutian mink disease parvovirus infection of mink peritoneal macrophages and human macrophage cell lines. *J. Virol.* 67, 2075-2082.
- Kanno, H., Wolfinbarger, J.B., Bloom, M.E., 1993b. Aleutian Mink Disease Parvovirus Infection of Mink Macrophages and Human Macrophage Cell Line U937: Demonstration of Antibody- Dependent Enhancement of Infection. *J Virol* 67, 7017-7024.
- Karstad, L., 1965. Viral Plasmacytosis (Aleutian Disease) in Mink. V. the Occurrence of Hyalin Glomerular Lesions and Fibrinoid Arteritis in Experimental Infections. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 29, 66-74.
- Karstad, L., Pridham, T.J., 1962. Aleutian disease of mink: I. Evidence of its viral etiology. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 26, 97-102.
- Kenyon, A.J., Helmboldt, C.F., Nielsen, S.W., 1963. Experimental Transmission of Aleutian Disease with Urine. *Am. J. Vet. Res.* 24, 1066-1067.
- Kenyon, A.J., Magnano, T., Helmboldt, C.F., Buko, L., 1966a. Aleutian disease in the ferret. *J Am Vet Med Assoc.* 149, 920-923.
- Kenyon, A.J., Williams jr., R.C., Howar, E.B., 1966b. Monoclonal Gamma-Globulins in Ferrets with Lymphoproliferative Lesions, en: *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine.* 123. 510-513.
- Kenyon, A.J., Kenyon, B.J., Hahn, E.C., 1978. Protides of the Mustelidae: immunoresponse of Mustelides to Aleutian mink disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 1167-1172.
- Knuuttila, A., 2015. Diagnostics and Epidemiology of Aleutian Mink Disease Virus. Doctoral thesis. Department of Veterinary Biosciences. Faculty of Veterinary. University of Helsinki.
- Knuuttila, A., Aronen, P., Saarinen, A., Vapalahti, O., 2009a. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant VP2 capsids for the detection of antibodies to aleutian mink disease virus. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1360-1365.
- Knuuttila, A., Uzcátegui, N., Kankkonen, J., Vapalahti, O., Kinnunen, P., 2009b. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus in Finland. *Vet. Microbiol.* 133, 228-238.

- Knuuttila, A., Aronen, P., Eerola, M., Gardner, I.A., Virtala, A.M.K., Vapalahti, O., 2014. Validation of an automated ELISA system for detection of antibodies to Aleutian mink disease virus using blood samples collected in filter paper strips. *Virol. J.* 11.
- Kowalczyk, M., Jakubczak, A., Horecka, B., Kostro, K., 2018. A comparative molecular characterization of AMDV strains isolated from cases of clinical and subclinical infection. *Virus Genes* 54, 561-569.
- Kowalczyk, M., Gąsior, B., Kostro, K., Borzym, E., Jakubczak, A., 2019a. Breeding parameters on a mink farm infected with Aleutian mink disease virus following the use of methisoprinol. *Arch. Virol.*
- Kowalczyk, M., Horecka, B., Jakubczak, A., 2019b. Aleutian Mink Disease Virus in the breeding environment in Poland and its place in the global epidemiology of AMDV. *Virus Res.* 270.
- LaDouceur, E.E.B., Anderson, M., Ritchie, B.W., Ciembor, P., Rimoldi, G., Piazza, M., Pesti, D., Clifford, D.L., Giannitti, F., 2015. Aleutian Disease: An Emerging Disease in Free-Ranging Striped Skunks (*Mephitis mephitis*) From California. *Vet. Pathol.* 52, 1250-1253.
- Lamhoujeb, S., Fliss, I., Ngazoa, S.E., Jean, J., 2008. Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3349-3355.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* 33, 159-174.
- Larsen, A.E., 1966. No Title. *Am. Fur Breed.* 39.
- Larsen, A.E., Porter, D.D., 1975. Pathogenesis of Aleutian disease of mink: identification of nonpersistent infections. *Infect. Immun.* 11, 92-94.
- Larsen, S., 2013. Development of a Method for the Detection of Aleutian Mink Disease Virus in Water Samples by. Doctoral Thesis. Faculty of Agriculture. Dalhousie Univ.
- Larsen, S., Alexandersen, S., Lund, E., Have, P., Hansen, M., 1984. Acute interstitial pneumonitis caused by Aleutian disease virus in mink kits. *Acta path. microbiol. immunol. Scand. Sect. A*, 92, 391-393.
- Leader, R.W., Padgett, G.A., Gorham, J.R., 1963. Studies of Abnormal Leukocyte Bodies in Mink. *Blood* 22, 477-484.
- Leimann, A., Knuuttila, A., Maran, T., Vapalahti, O., Saarma, U., 2015. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus (AMDV) in Estonia, and a global phylogeny of AMDV. *Virus Res.* 199, 56-61.

- Lennette, E.H., 2017. Laboratory diagnosis of viral infections: general principles, en: MacLachlan, N.J., Dubovi, E.J. (Eds.), Fenner's Veterinary Virology. Academic Press, Londres, Reino Unido, 105-129.
- Li, L., Pesavento, P.A., Woods, L., Clifford, D.L., Luff, J., Wang, C., Delwart, E., 2011. Novel amdovirus in gray foxes. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1876-1878.
- Li, Y., Huang, J., Jia, Y., Du, Y., Jiang, P., R., Z., 2012. Genetic characterization of Aleutian mink disease viruses isolated in China. *Virus Genes* 45, 24-30.
- Liu, D., Li, J., Shi, K., Zeng, F., Zong, Y., Leng, X., Lu, H., Du, R., 2018. Construction and Immunogenicity Analysis of Whole-Gene Mutation DNA Vaccine of Aleutian Mink Virus Isolated Virulent Strain. *Viral Immunol.* 31, 69-77.
- Lohi, O., Hansen, B.K., Johannessen, K-R., Smeds, K. and Clausen, J., 2015. More about Beautiful Fur Animals - genetics of colours, fur, defects and diseases. Working Group for Fur Animals, Nordic Association of Agricultural Scientist, in cooperation with Copenhagen Fur.
- Lu, T., Wang, Y., Ge, J., Ma, Q., Yan, W., Zhang, Y., Zhao, L., Chen, H., 2018. Identification and characterization of a novel B-cell epitope on Aleutian Mink Disease virus capsid protein VP2 using a monoclonal antibody. *Virus Res.* 248, 74-79.
- Mallén, M.S., Ugalde, E.L., Balcazar, M.R., Bolívar, J.I., Meyran, S., 1950. Precipitation of Abnormal Serums by Lugol's Solution. *Am. J. Clin. Pathol.* 20, 39-45.
- Mani, B., Gerber, M., Lieby, P., Boschetti, N., Kempf, C., Ros, C., 2007. Molecular mechanism underlying B19 virus inactivation and comparison to other parvoviruses. *Transfusion* 47, 1765-1774.
- Mañas, S., 2015. Conservación del visón europeo (*Mustela lutreola*): Implicaciones del Parvovirus de la enfermedad Aleutiana y relaciones demográficas con sus principales competidores potenciales. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Mañas, S., Ceña, J.C., Ruiz-Olmo, J., Palazón, S., Domingo, M., Wolfinbarger, J.B., Bloom, M.E., 2001. Aleutian mink disease parvovirus in wild riparian carnivores in Spain. *J. Wildl. Dis.* 37, 138-144.
- Mañas, S., Gómez, A., Asensio, V., Palazón, S., Podra, M., Alarcia, O.E., Ruiz-Olmo, J., Casal, J., 2016. Prevalence of Antibody to Aleutian Mink Disease Virus in European Mink (*Mustela lutreola*) and American Mink (*Neovison vison*) in Spain. *J. Wildl. Dis.* 52, 22-32.
- Matheson, C.D., Gurney, C., Esau, N., Lehto, R., 2014. Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. *Open Enzym. Inhib. J.* 3, 38-45.

- McDonnell, G., Russell, A.D., 1999. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance (vol 12,pg 147, 1999). *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 147-179.
- McGuire, T.C., Crawford, T.B., 1980. Antibodies to Aleutian Disease Virus in Human Sera. *J. Infect. Dis.* 142, 625-625.
- McGuire, T.C., Perryman, L.E., Gorham, J.R., 1979. Mechanisms of Anemia in Aleutian Disease Viral Infection of Mink. *Vet. Microbiol.* 4, 17-27.
- McKenna, R., Olson, N.H., Chipman, P.R., Baker, T.S., Booth, T.F., Christensen, J., Aasted, B., Fox, J.M., Bloom, M.E., Wolfinbarger, J.B., Agbandje-McKenna, M., 1999. Three-dimensional structure of Aleutian mink disease parvovirus: implications for disease pathogenicity. *J. Virol.* 73, 6882-6891.
- Mora, N., Rosales, C., 2009. Funciones de receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica. *Rev. Investig. Clin.* 61, 313-326.
- Mori, S., Wolfinbarger, J.B., Miyazawa, M., Bloom, M.E., 1991. Replication of Aleutian mink disease parvovirus in lymphoid tissues of adult mink: involvement of follicular dendritic cells and macrophages. *J Virol* 65, 952-956.
- Mori, S., Nose, M., Miyazawa, M., Kyogoku, M., Wolfinbarger, J.B., Bloom, M.E., 1992. Emerging concepts in the pathogenesis of Aleutian mink disease: Identification of the sites of viral replication and analysis of two types of renal lesions, en: Yoshida, T. O. and Wilson, J.M. (Ed.), molecular approaches to the study and treatment of human diseases. Elsevier B.V., Amsterdam, 301-308.
- Mori, S., Nose, M., Miyazawa, M., Kyogoku, M., Wolfinbarger, J.B., Bloom, M.E., 1994. Interstitial nephritis in Aleutian mink disease. Possible role of cell-mediated immunity against virus-infected tubular epithelial cells. *Am. J. Pathol.* 144, 1326-1333.
- Morodd, N., Einarsson, E.J., Lohi, O., Joergensen, G., 1988. Beautiful Fur Animals and their color genetics. Scientifur.
- Mouritsen, S., Aasted, B., Hoier-Madsen, M., 1989. Mink with Aleutian Disease have autoantibodies to some Autoantigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 23, 179-186.
- Munck, C., 1990. The possible influence of recent vaccination on the serological reactions in mink against Aleutian Disease Virus Antigen. *Scientifur* 14, 45-48.
- Murakami, M., Matsuba, C., Une, Y., Nomura, Y., Fujitani, H., 2001. Nucleotide sequence and polymerase chain reaction / restriction fragment length polymorphism analyses of Aleutian disease virus in ferrets in Japan. *J Vet Diagn Invest* 13, 337-340.
- Murphy, B.D., 1996. Female reproductive system, en: Mink... Biology, Health and Disease. Grafic and Print Services; University of Guelph, Guelph, Guelph, Ontario.

- Neira, V., Rabinowitz, P., Rendahl, A., Paccha, B., Gibbs, S.G., Torremorell, M., 2016. Characterization of Viral Load, Viability and Persistence of Influenza A Virus in Air and on Surfaces of Swine Production Facilities. PLoS One 11(1): e0146616.
- Nituch, L.A., Bowman, J., Beauclerc, K.B., Schulte-Hostedde, A.I., 2011. Mink farms predict aleutian disease exposure in wild american mink. PLoS One 6(7): e21693.
- Nituch, L.A., Bowman, J., Wilson, P., Schulte-Hostedde, A.I., 2012. Molecular epidemiology of Aleutian disease virus in free-ranging domestic, hybrid, and wild mink. Evol. Appl. 5, 330-340.
- Nituch, L.A., Bowman, J., Wilson, P.J., Schulte-Hostedde, A.I., 2015. Aleutian mink disease virus in striped skunks (*Mephitis mephitis*): evidence for cross-species spillover. J. Wildl. Dis. 51, 389-400.
- Nöremark, M., Lewerin, S.S., Ernholm, L., Frössling, J., 2016. Swedish Farmers' opinions about biosecurity and their intention to make professionals use clean protective clothing when entering the stable. Front. Vet. Sci. 3.
- Nuanualsuwan, S., Cliver, D.O., 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. J. Virol. Methods 104, 217-225.
- Obel, A., 1959. Studies on a disease of mink with systemic proliferation of the plasma cells. J. Vet. Res. 20, 384-393.
- Ohshima, K., Shen, D.T., Henson, J.B., Gorham, J.R., 1978. Comparison of the lesions of Aleutian disease in mink and hypergammaglobulinemia in ferrets. Am. J. Vet. Res. 39, 653-657.
- Oie, K.L., Durrant, G., Wolfinbarger, J.B., Martin, D., Costello, F., Perryman, S., Hogan, D., Hadlow, W.J., Bloom, M.E., 1996. The relationship between capsid protein (VP2) sequence and pathogenicity of Aleutian mink disease parvovirus (ADV): a possible role for raccoons in the transmission of ADV infections. J. Virol. 70, 852-861.
- Oleksiewicz, M.B., Alexandersen, S., 1997. S-phase-dependent cell cycle disturbances caused by Aleutian mink disease parvovirus. J. Virol. 71, 1386-1396.
- Oleksiewicz, M.B., Costello, F., Huhtanen, M., Wolfinbarger, J.B., Alexandersen, S., Bloom, M.E., 1996. Subcellular localization of Aleutian mink disease parvovirus proteins and DNA during permissive infection of Crandell feline kidney cells. J. Virol. 70, 3242-3247.
- Oleksiewicz, M.B., Wolfinbarger, J.B., Bloom, M.E., 1998. A comparison between permissive and restricted infections with Aleutian mink disease parvovirus (ADV): Characterization of the viral protein composition at nuclear sites of virus replication. Virus Res. 56, 41-51.

- Olofsson, A., Mittelholzer, C., Berndtsson, L.T., Lind, L., Mejerland, T., Belák, S., 1999. Unusual, high genetic diversity of Aleutian mink disease virus. *J. Clin. Microbiol.* 37, 4145-4149.
- Onderka, D., 1996. Integument of mink, en: Hunter, D.B. & L. (Ed.), *Mink... Biology, Health and Disease*. Grafic and Print Services; University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.
- Opel, K.L., Chung, D., McCord, B.R., 2010. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR, en: *Journal of Forensic Sciences* 55, 25-33.
- Padgett, G.A., Leader, R.W., Gorham, J.R., O'Mary, C.C., 1964. the Familial Occurrence of the Chediak-Higashi Syndrome in Mink and Cattle. *Genetics* 49, 505-512.
- Padgett, G.A., Gorham, J.R., Henson, J.B., 1967. Epizootiologic Studies of Aleutian Disease: I. Transplacental Transmission of the Virus. *J. Infect. Dis.* 117, 35-38.
- Padgett, G.A., Holland, J.M., Henson, J.B., Davis, W.C., 1969. The Chediak-Higashi Syndrome: A Comparative Review, en: Al., A.H. et (Ed.), *Current Topics in Pathology. Current Topics in Pathology (Ergebnisse der Pathologie)*. Springer, Berlin, Heidelberg, 175-194.
- Palazón, S., Ruiz-Olmo, J., 1997. El visón europeo (*Mustela lutreola*) y el visón americano (*Mustela vison*) en España., Ministerio de Medio Ambiente. Colección Técnica. Madrid.
- Parrish, C.R., 2016. *Parvoviridae*, en: MacLachlan, N.J., Dubovi, E.J. (Eds.), *Fenner's Veterinary Virology*. Academic Press, 245-257.
- Patel, J.R., Heldens, J.G.M., Bakonyi, T., Rusvai, M., 2012. Important mammalian veterinary viral immunodiseases and their control. *Vaccine* 30, 1767-1781.
- Pecson, B.M., Martin, L.V., Kohn, T., 2009. Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: Advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5544-5554.
- Pecson, B.M., Ackermann, M., Kohn, T., 2011. Framework for using quantitative PCR as a nonculture based method to estimate virus infectivity. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2257-2263.
- Pénzes, J.J., Marsile-Medun, S., Agbandje-McKenna, M., Gifford, R.J., 2018. Endogenous amdoparvovirus-related elements reveal insights into the biology and evolution of vertebrate parvoviruses. *Virus Evol.* 4, 1-9.



- Persson, S., Jensen, T.H., Blomström, A.L., Appelberg, M.T., Magnusson, U., 2015. Aleutian mink disease virus in free-ranging mink from Sweden. *PLoS One* 10(3): e0122194.
- Pitkin, A., Deen, J., Dee, S., 2009. Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 73, 298-302.
- Porter, D.D., Cho, H.J., 1980. Aleutian Disease of Mink: A Model for Persistent Infection, en: Fraenkael-Conrat, H. *et al.* (Ed.), *Comprehensive Virology*. Plenum Press, New York, 233-256.
- Porter, D.D., Dixon, F.J., 1966. Electrophoretic and immunoelectrophoretic characterization of normal mink serum proteins. *Am J Vet Res.* 27, 335-338.
- Porter, D.D., Larsen, A.E., 1967. Aleutian Disease of Mink: Infectious Virus-Antibody Complexes in the Serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126, 680-682.
- Porter, D.D., Larsen, A.E., 1974. Aleutian disease of mink. *Prog. Med. Virol.* 18, 32-47.
- Porter, D.D., Dixon, F.J., Larsen, A.E., 1965. Metabolism and function of gammaglobulin in aleutian disease of mink. *Div. Exp. Pathol. Scripps Clin. Res. Found.* 104, 889-901.
- Porter, D.D., Larsen, A.E., Porter, H.G., 1969. The pathogenesis of Aleutian disease of mink. I. In vivo viral replication and the host antibody response to viral antigen. *J. Exp. Med.* 130, 575-93.
- Porter, D.D., Larsen, A.E., Porter, H.G., 1972. The pathogenesis of Aleutian disease of mink. II. Enhancement of tissue lesions following the administration of a killed virus vaccine or passive antibody. *J. Immunol.* 109, 1-7.
- Porter, D.D., Larsen, A.E., Porter, H.G., 1973. The pathogenesis of Aleutian disease of mink. III. Immune complex arteritis. *Am. J. Pathol.* 71, 331-44.
- Porter, D.D., Larsen, A.E., Cox, N.A., Porter, H.G., Suffin, S.C., 1977a. Isolation of Aleutian disease virus of mink in cell culture. *Intervirology* 8, 129-144.
- Porter, D.D., Larsen, A.E., Porter, H.G., 1977b. Reduced severity of lesions in mink infected transplacentally with Aleutian disease virus. *J. Immunol.* 119, 873-876.
- Porter, D.D., Larsen, A.E., Porter, H.G., 1980. Aleutian disease of mink. *Adv. Immunol.* 29, 261-286.
- Porter, H.G., Porter, D.D., Larsen, A.E., 1982. Aleutian disease in ferrets. *Infect. Immun.* 36, 379-386.

- Porter, D.D., Porter, H.G., Suffin, S.C., Larsen, A.E., 1984. Immunoglobulin classes of Aleutian disease virus antibody. *Infect. Immun.* 43, 463-466.
- Porterfield, J.S., 1986. Antibody-Dependent Enhancement of Viral Infectivity. *Adv. Virus Res.* 31, 335-355.
- Prieto, A., Díaz-Cao, J.M., Fernández-Antonio, R., Panadero, R., López-Lorenzo, G., Díaz, P., Pérez-Creo, A., Morrondo, M.P., Fernández, G., 2018. Lesser housefly (*Fannia canicularis*) as possible mechanical vector for Aleutian mink disease virus. *Vet. Microbiol.* 221, 90-93.
- Qiu, J., Cheng, F., Burger, L.R., Pintel, D., 2006. The Transcription Profile of Aleutian Mink Disease Virus in CRFK Cells Is Generated by Alternative Processing of Pre-mRNAs Produced from a Single Promoter. *J. Virol.* 80, 654-662.
- Råberg, L., Sim, D., Read, A.F., 2007. Disentangling Genetic Variation for Resistance and Tolerance to Infectious Diseases in Animals. *Science* 318, 812-814.
- Race, R.E., Chesebro, B., Bloom, M.E., Aasted, B., Wolfenbarger, J., 1986. Monoclonal antibodies against Aleutian disease virus distinguish virus strains and differentiate sites of virus replication from sites of viral antigen sequestration. *J. Virol.* 57, 285-293.
- Real Decreto 1528/2012, 2012. Por el que se establecen las normas aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano., Boletín Oficial del Estado.
- Real Decreto 476/2014, 2014. Por el que se regula el registro nacional de movimientos de subproductos animales y los productos derivados no destinados a consumo humano., Boletín Oficial del Estado.
- Reglamento (CE) no1069/2009, 2009. Por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano y por el que se deroga el Reglamento (CE) no1774/2002 (Reglamento sobre subproductos animales). D. Of. de la Unión Europea.
- Reglamento (CE) No142/2011, 2011. Por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) no1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados a c, D.of. de la Unión Europea.
- Ridley, A., Morris, V., Gittins, J., Cawthraw, S., Harris, J., Edge, S., Allen, V., 2011. Potential sources of *Campylobacter* infection on chicken farms: Contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel. *J. Appl. Microbiol.* 111, 233-244.

- Rodrigues, D.C., Simões, L., Mullins, J., Lampa, S., Mendes, R.C., Fernandes, C., Rebelo, R., Santos-Reis, M., 2014. Tracking the expansion of the American mink (*Neovison vison*) range in NW Portugal. *Biol. Invasions* 17, 13-22.
- Rodríguez, R.A., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2009. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 297-307.
- Rodríguez-Lázaro, D., Cook, N., Ruggeri, F.M., Sellwood, J., Nasser, A., Nascimento, M.S.J., D'Agostino, M., Santos, R., Saiz, J.C., Rzezutka, A., Bosch, A., Gironés, R., Carducci, A., Muscillo, M., Kovač, K., Diez-Valcarce, M., Vantarakis, A., von Bonsdorff, C.H., de Roda Husman, A.M., Hernández, M., van der Poel, W.H.M., 2012. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 786-814.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539-542.
- Ros, C., Baltzer, C., Mani, B., Kempf, C., 2006. Parvovirus uncoating in vitro reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability. *Virology* 345, 137-147.
- Russell, A.S., Percy, J.S., Cho, H.J., 1975. Poly IC therapy in aleutian disease of mink. *Can. J. Comp. Med.* 39, 240-249.
- Rutjes, S.A., Italiaander, R., Van Den Berg, H.H.J.L., Lodder, W.J., De Roda Husman, A.M., 2005. Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the nucliSens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3734-3740.
- Ryt-Hansen, P., Hagberg, E.E., Chriél, M., Struve, T., Pedersen, A.G., Larsen, L.E., Hjulsager, C.K., 2017a. Global phylogenetic analysis of contemporary aleutian mink disease viruses (AMDVs). *Virol. J.* 14, 1-6.
- Ryt-Hansen, P., Hjulsager, C.K., Hagberg, E.E., Chriél, M., Struve, T., Pedersen, A.G., Larsen, L.E., 2017b. Outbreak tracking of Aleutian mink disease virus (AMDV) using partial NS1 gene sequencing. *Virol. J.* 14, 1-9.
- Saifuddin, M., Fox, J.G., 1996. Identification of a DNA segment in ferret Aleutian disease virus similar to a hypervariable capsid region of mink Aleutian disease parvovirus. *Arch. Virol.* 141, 1329-1336.
- Sánchez, G., Elizaquível, P., Aznar, R., 2012. Discrimination of Infectious Hepatitis A Viruses by Propidium Monoazide Real-Time RT-PCR. *Food Environ. Virol.* 4, 21-25.

- Sánchez-Migallón Guzmán, D., Carvajal, A., García-Marín, J.F., Ferreras, M.C., Pérez, V., Mitchell, M., Urra, F., Ceña, J.C., 2008. Aleutian disease serology, protein electrophoresis, and pathology of the European mink (*Mustela lutreola*) from Navarra, Spain. *J. Zoo Wildl. Med.* 39, 305-13.
- Sang, Y., Ma, J., Hou, Z., Zhang, Y., 2012. Phylogenetic analysis of the VP2 gene of Aleutian mink disease parvoviruses isolated from 2009 to 2011 in China. *Virus Genes* 45, 31-37.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014-1026.
- Schuieler, S., Bloom, M.E., Kaaden, O.R., Truyen, U., 1997. Sequence analysis of the lymphotropic Aleutian disease parvovirus ADV-SL3. *Arch. Virol.* 142, 157-166.
- Shackelford, R.M., 1950. Genetics of the Ranch Mink. Pilsbury Publishers, Inc., in cooperation with Black Fox Magazine, New York.
- Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Truyen, U., Holmes, E.C., 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 379-384.
- Shackelton, L.A., Hoelzer, K., Parrish, C.R., Holmes, E.C., 2007. Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses. *J. Gen. Virol.* 88, 3294-3301.
- Shen, D.T., Gorham, J.R., 1973. Filth Flies and Aleutian Disease of Mink. *Northeastern Mink Farmer* 149.
- Shen, D.T., Gorham, J.R., Harwood, R.F., Padgett, G.A., 1973. The persistence of Aleutian disease virus in the mosquito *Aedes fitchii*. *Arch. Gesamte Virusforsch* 40, 375-381.
- Shen, D.T., Leendertsen, L.W., Gorham, J.R., 1981. Evaluation of chemical disinfectants for aleutian disease virus of mink. *Am. J. Vet. Res.* 42, 838-840.
- Simon-Grifé, M., Martín-Valls, G.E., Vilar-Ares, M.J., García-Bocanegra, I., Martín, M., Mateu, E., Casal, J., 2013. Biosecurity practices in Spanish pig herds: Perceptions of farmers and veterinarians of the most important biosecurity measures. *Prev. Vet. Med.* 110, 223-231.
- Stetzenbach, L.D., Buttner, M.P., Cruz, P., 2004. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 170-174.
- Stolze, B., Kaaden, O.R., 1987. Apparent lack of neutralizing antibodies in Aleutian disease is due to masking of antigenic sites by phospholipids. *Virology* 158, 174-80.
- Storch, G.A., Wang, D., 2013. Diagnostic Virology, en: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 414-452.

- Thrusfield, M., 2007. The Control and Eradication of Disease, en: Veterinary Epidemiology. Blackwell Publishing, Oxford, 385-403.
- Tijssen, P., Agbandje-McKenna, M., Almendral, J.M., Bergoin, M., Flegel, T.W., Hedman, K., Kleinschmidt, J., Li, Y., Pintel, D.J., Tattersall, P., 2012. Family *Parvoviridae*, en: King, AM.; Lefkowitz, E.; Adams, MJ.; Carstens, E. (Ed.), Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, 405-425.
- Tomas, M.E., Kundrapu, S., Thota, P., Sunkesula, V.C.K., Cadnum, J.L., Mana, T.S.C., Jencson, A., O'Donnell, M., Zabarsky, T.F., Hecker, M.T., Ray, A.J., Wilson, B.M., Donskey, C.J., 2015. Contamination of health care personnel during removal of personal protective equipment. JAMA Intern. Med. 175, 1904-1910.
- Uttenthal, A., 1992. Screening for antibodies against Aleutian disease virus (ADV) in mink. Elucidation of dubious results by additive counterimmunoelectrophoresis. Appl. Theor. Electrophor. 3, 83-84.
- van Dawen, S., Kaaden, O.R., Roth, S., 1983. Propagation of Aleutian Disease Parvovirus in Cell Line CCC Clone 81. Arch. Virol. 77, 39-50.
- Vidal-Figueroa, T., Delibes, M., 1987. Primeros datos sobre el visón americano (*Mustela visón*) en el suroeste de Galicia y noroeste de Portugal. Ecología 1, 145-152.
- Virtanen, J., Smura, T., Aaltonen, K., Moisander-Jylhä, A.M., Knuuttila, A., Vapalahti, O., Sironen, T., 2019. Co-circulation of highly diverse aleutian mink disease virus strains in Finland. J. Gen. Virol. 100, 227-236.
- Vong, S., Ly, S., Mardy, S., Holl, D., Buchy, P., 2008. Environmental contamination during influenza A virus (H5N1) outbreaks, Cambodia, 2006. Emerg. Infect. Dis. 14, 1303-1305.
- Wagner, B.M., 1963. Aleutian Disease Of Mink. Olympic Rep. 6, 386-388.
- Wang, Z., Wu, W., Hu, B., Zhang, H., Bai, X., Zhao, J., Zhang, L., Yan, X., 2014. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus in China. Virus Res. 184, 14-19.
- Weesendorp, E., Landman, W.J.M., Stegeman, A., Loeffen, W.L.A., 2008. Detection and quantification of classical swine fever virus in air samples originating from infected pigs and experimentally produced aerosols. Vet. Microbiol. 127, 50-62.
- Welchman, D.D., Oxenham, M., Done, S.H., 1993. Aleutian disease in ferrets: diagnostic findings and survey results. Vet. Rec. 132, 479-484.
- Wiedbrauk, D.L., Bloom, M.E., Lodmell, D.L., 1986a. Mink parvoviruses and interferons: in vitro studies. J. Virol. 60, 1179-1182.

- Wiedbrauk, D.L., Hadlow, W.J., Ewalt, L.C., Lodmell, D.L., 1986b. Interferon response in normal and Aleutian disease virus-infected mink. *J. Virol.* 59, 514-517.
- Wilson, D.J., Baldwin, T.J., Whitehouse, C.H., Hullinger, G., 2015. Causes of mortality in farmed mink in the Intermountain West, North America. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 27, 470-475.
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741-3751.
- Willadsen, C.M., Dietz, H.H., 2009. Redegørelse for Plamacytose bekæmpelsen in Denmark.
- Wright, P.F., Wilkie, B.N., 1982. Detection of antibody in Aleutian disease of mink: comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and counterimmunoelectrophoresis. *Am. J. Vet. Res.* 43, 856-858.
- Xi, J., Wang, J., Yu, Y., Zhang, X., Mao, Y., Hou, Q., Liu, W., 2016. Genetic characterization of the complete genome of an Aleutian mink disease virus isolated in north China. *Virus Genes* 52, 463-473.
- Yamaguchi, N., Macdonald, D.W., 2001. Detection of Aleutian disease antibodies in feral American mink in Southern England. *Vet. Rec.* 149, 485-488.
- Yang, W., Gu, A.Z., Zeng, S.Y., Li, D., He, M., Shi, H.C., 2011. Development of a combined immunomagnetic separation and quantitative reverse transcription-PCR assay for sensitive detection of infectious rotavirus in water samples. *J. Microbiol. Methods* 84, 447-453.
- Zádori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I.R., Tijssen, P., 2001. A Viral Phospholipase A2Is Required for Parvovirus Infectivity. *Dev. Cell* 1, 291-302.
- Zehender, G., De Maddalena, C., Canuti, M., Zappa, A., Amendola, A., Lai, A., Galli, M., Tanzi, E., 2010. Rapid molecular evolution of human bocavirus revealed by Bayesian coalescent inference. *Infect. Genet. Evol.* 10, 215-220.
- Zhang, Z., Wang, B., Hu, S., Zhang, J., He, X., Zheng, S., 2015. Detection of Aleutian disease virus by loop-mediated isothermal amplification. *VirusDisease* 26, 203-206.



# **ANEXOS**





## ANEXO I

Listado con la codificación, procedencia y nº de acceso en GenBank de las secuencias de la diana molecular NS1 previamente descritas en GenBank que han sido utilizadas para el análisis filogenético global realizado en el estudio 4 de esta tesis.

Código secuencia	Procedencia	Nº acceso GenBank
Gray Fox Amdovirus	Estados Unidos	JN202450.1
AMDV-G	Estados Unidos	JN040434.1
AMDV-K	Dinamarca	X77084.1
AMDV-SL3	Alemania	X97629.1
AMDV-United	Estados Unidos	X77085.1
AMDV-Utah I	Estados Unidos	X77083.1
CHN1	China	EU652446.1
CHN2	China	EU652447.1
CHN3	China	GU108231.1
CHN4	China	GU108232.1
CHN5	China	EU652450.1
CHN6	China	EU652451.1
CHN7	China	EU652452.1
CHN8	China	EU652454.1
CHN9	China	EU652455.1
CHN10	China	EU652456.1
CHN11	China	GU269892.1
CND1	Canadá	MG366604.1
CND2	Canadá	MG366605.1
CND3	Canadá	MG366610.1
CND4	Canadá	MG366611.1
CND5	Canadá	MG366612.1
CND6	Canadá	MG366621.1
CND7	Canadá	MG366622.1
CND8	Canadá	MG366623.1
CND9	Canadá	MG366648.1
CND10	Canadá	MG366649.1
CND11	Canadá	MG366650.1
CND12	Canadá	MG366651.1
CND13	Canadá	MG366652.1
CND14	Canadá	MG366653.1
CND15	Canadá	MG366654.1
CND16	Canadá	MG366655.1
CND17	Canadá	MG366656.1
CND18	Canadá	MG366657.1
CND19	Canadá	MG366658.1
CND20	Canadá	MG366659.1
CND21	Canadá	MG366662.1
CND22	Canadá	MG366663.1
CND23	Canadá	MG366664.1
CND24	Canadá	MG366676.1
CND25	Canadá	MG366677.1
CND26	Canadá	MG366681.1
CND27	Canadá	MG366713.1
DEN1	Dinamarca	MG366724.1
DEN2	Dinamarca	MF073922.1
DEN3	Dinamarca	MF073923.1
DEN4	Dinamarca	MF073925.1
DEN5	Dinamarca	MF073927.1
DEN6	Dinamarca	MF073931.1
DEN7	Dinamarca	MF073933.1
DEN8	Dinamarca	MF073938.1
DEN9	Dinamarca	MF073963.1
DEN10	Dinamarca	MF073971.1

Código secuencia	Procedencia	Nº acceso GenBank
DEN11	Dinamarca	MF073972.1
DEN12	Dinamarca	MF073974.1
DEN13	Dinamarca	MF073975.1
DEN14	Dinamarca	MF073976.1
DEN15	Dinamarca	MF073977.1
DEN16	Dinamarca	MF073978.1
DEN17	Dinamarca	MF073979.1
DEN18	Dinamarca	MF073980.1
DEN19	Dinamarca	MF073981.1
DEN20	Dinamarca	MF073982.1
DEN21	Dinamarca	MF073983.1
DEN22	Dinamarca	MF073984.1
DEN23	Dinamarca	MF073985.1
DEN24	Dinamarca	MF073986.1
DEN25	Dinamarca	MF073987.1
DEN26	Dinamarca	MF073988.1
DEN27	Dinamarca	MF073989.1
DEN28	Dinamarca	MF073992.1
DEN29	Dinamarca	MF073996.1
DEN30	Dinamarca	MF073998.1
DEN31	Dinamarca	MF073999.1
DEN32	Dinamarca	MF074000.1
DEN33	Dinamarca	MF074002.1
DEN34	Dinamarca	MF074003.1
DEN35	Dinamarca	MF074004.1
DEN36	Dinamarca	MF074005.1
DEN37	Dinamarca	MF074009.1
DEN38	Dinamarca	MF074010.1
DEN39	Dinamarca	MF074011.1
DEN40	Dinamarca	MF074012.1
DEN41	Dinamarca	MF074013.1
DEN42	Dinamarca	MF074014.1
DEN43	Dinamarca	MF074015.1
DEN44	Dinamarca	MF074016.1
DEN45	Dinamarca	MF074017.1
DEN46	Dinamarca	MF074018.1
DEN47	Dinamarca	MF074020.1
DEN48	Dinamarca	MF074021.1
DEN49	Dinamarca	MF074022.1
DEN50	Dinamarca	MF074031.1
DEN51	Dinamarca	MF074032.1
DEN52	Dinamarca	MF074033.1
DEN53	Dinamarca	MF074034.1
DEN54	Dinamarca	MF074035.1
DEN55	Dinamarca	MF074036.1
DEN56	Dinamarca	MF074038.1
DEN57	Dinamarca	MF074040.1
DEN58	Dinamarca	MF074041.1
DEN59	Dinamarca	MF074043.1
DEN60	Dinamarca	MF074044.1
DEN61	Dinamarca	MF074046.1
DEN62	Dinamarca	MF074047.1
DEN63	Dinamarca	MF074051.1
DEN64	Dinamarca	MF074053.1
DEN65	Dinamarca	MF074054.1
FIN1	Finlandia	MG366624.1
FIN2	Finlandia	MG366625.1
FIN3	Finlandia	MG366626.1
FIN4	Finlandia	MG366628.1
FIN5	Finlandia	MG366647.1

Código secuencia	Procedencia	Nº acceso GenBank
FIN6	Finlandia	MG366669.1
FIN7	Finlandia	MG366671.1
FIN8	Finlandia	MG366672.1
FIN9	Finlandia	MG366674.1
FIN10	Finlandia	MG366683.1
FIN11	Finlandia	MG366684.1
FIN12	Finlandia	MG366688.1
FIN13	Finlandia	MG366694.1
FIN14	Finlandia	MG366695.1
FIN15	Finlandia	MG366696.1
FIN16	Finlandia	MG366699.1
FIN17	Finlandia	MG366700.1
FIN18	Finlandia	MG366704.1
FIN19	Finlandia	MG366706.1
FIN20	Finlandia	MG366707.1
FIN21	Finlandia	MG366709.1
FIN22	Finlandia	MG366786.1
FIN23	Finlandia	MG366787.1
GRE1	Grecia	MG366607.1
GRE2	Grecia	MG366613.1
GRE3	Grecia	MG366645.1
GRE4	Grecia	MG366646.1
GRE5	Grecia	MG366679.1
GRE6	Grecia	MG366682.1
GRE7	Grecia	MG366690.1
GRE8	Grecia	MG366727.1
GRE9	Grecia	MG366728.1
GRE10	Grecia	MG366733.1
GRE11	Grecia	MG366735.1
GRE12	Grecia	MG366769.1
GRE13	Grecia	MG366771.1
GRE14	Grecia	MG366772.1
GRE15	Grecia	MG366773.1
GRE16	Grecia	MG366807.1
ITA1	Italia	MG366606.1
ITA2	Italia	MG366665.1
ITA3	Italia	MG366710.1
ITA4	Italia	MG366711.1
ITA5	Italia	MG366712.1
ITA6	Italia	MG366800.1
ITA7	Italia	MG366801.1
ITA8	Italia	MG366804.1
ITA9	Italia	MG366805.1
ITA10	Italia	MG366806.1
LAT1	Letonia	MG366615.1
LAT2	Letonia	MG366616.1
LAT3	Letonia	MG366617.1
LIT1	Lituania	MG366751.1
LIT2	Lituania	MG366752.1
LIT3	Lituania	MG366768.1
LIT4	Lituania	MG366778.1
LIT5	Lituania	MG366779.1
NED1	Países Bajos	MG366608.1
NED2	Países Bajos	MG366609.1
NED3	Países Bajos	MG366639.1
NED4	Países Bajos	MG366640.1
NED5	Países Bajos	MG366642.1
NED6	Países Bajos	MG366643.1
NED7	Países Bajos	MG366644.1
NED8	Países Bajos	MG366714.1

Código secuencia	Procedencia	Nº acceso GenBank
NED9	Países Bajos	MG366715.1
NED10	Países Bajos	MG366716.1
NED11	Países Bajos	MG366717.1
NED12	Países Bajos	MG366718.1
NED13	Países Bajos	MG366722.1
NED14	Países Bajos	MG366723.1
NED15	Países Bajos	MG366725.1
NED16	Países Bajos	MG366731.1
NED17	Países Bajos	MG366732.1
NED18	Países Bajos	MG366734.1
NED19	Países Bajos	MG366737.1
NED20	Países Bajos	MG366738.1
NED21	Países Bajos	MG366750.1
NED22	Países Bajos	MG366758.1
NED23	Países Bajos	MG366759.1
NED24	Países Bajos	MG366760.1
NED25	Países Bajos	MG366761.1
NED26	Países Bajos	MG366762.1
NED27	Países Bajos	MG366763.1
NED28	Países Bajos	MG366764.1
NED29	Países Bajos	MG366765.1
NED30	Países Bajos	MG366774.1
NED31	Países Bajos	MG366775.1
NED32	Países Bajos	MG366776.1
NOR1	Noruega	MG366678.1
POL1	Polonia	MG366719.1
POL2	Polonia	MG366721.1
POL3	Polonia	MG366726.1
POL4	Polonia	MG366736.1
POL5	Polonia	MG366739.1
POL6	Polonia	MG366740.1
POL7	Polonia	MG366741.1
POL8	Polonia	MG366742.1
POL9	Polonia	MG366743.1
POL10	Polonia	MG366744.1
POL11	Polonia	MG366747.1
POL12	Polonia	MG366748.1
POL13	Polonia	MG366749.1
POL14	Polonia	MG366781.1
POL15	Polonia	MG366782.1
POL16	Polonia	MG366783.1
POL17	Polonia	MG366799.1
POL18	Polonia	MG366802.1
POL19	Polonia	MG366803.1
SPA1	España	MG366790.1
SPA2	España	MG366791.1
SPA3	España	MG366792.1
SPA4	España	MG366793.1
SWE1	Suecia	MG366675.1
SWE2	Suecia	MG366720.1
SWE3	Suecia	MG366755.1
SWE4	Suecia	MG366756.1
SWE5	Suecia	MG366757.1
SWE6	Suecia	MG366766.1
SWE7	Suecia	MG366767.1
SWE8	Suecia	MG366777.1
SWE9	Suecia	MG366784.1
SWE10	Suecia	MG366785.1
SWE11	Suecia	MG366789.1
SWE12	Suecia	MG366808.1



Código secuencia	Procedencia	Nº acceso GenBank
SWE13	Suecia	MG366809.1
SWE14	Suecia	MG366810.1
SWE15	Suecia	MG366815.1
SWE16	Suecia	MG366816.1
SWE17	Suecia	MG366817.1
SWE18	Suecia	MF073961.1
USA1	Estados Unidos	MG366618.1
USA2	Estados Unidos	MG366619.1
USA3	Estados Unidos	MG366620.1
USA4	Estados Unidos	MG366629.1
USA5	Estados Unidos	MG366630.1
USA6	Estados Unidos	MG366631.1
USA7	Estados Unidos	MG366632.1
USA8	Estados Unidos	MG366633.1
USA9	Estados Unidos	MG366634.1
USA10	Estados Unidos	MG366635.1
USA11	Estados Unidos	MG366636.1
USA12	Estados Unidos	MG366637.1
USA13	Estados Unidos	MG366691.1
USA14	Estados Unidos	MG366692.1
USA15	Estados Unidos	MG366693.1



**ANEXO II**

Listado con la codificación, procedencia y n° de acceso en GenBank de las secuencias de la diana molecular VP2 previamente descritas en GenBank que han sido utilizadas para el análisis filogenético global realizado en el estudio 4 de esta tesis.

Código secuencia	Procedencia	N° acceso GenBank
Gray Fox Amdovirus	Estados Unidos	JN202450.1
AMDV-G	Estados Unidos	JN040434.1
AMDV-Pullman	Estados Unidos	U39014.1
AMDV-SL3	Alemania	X97629.1
AMDV-TR	Estados Unidos	U39013.1
AMDV-Utah I	Estados Unidos	U39015.1
BEL1	Bielorrusia	KJ174163.1
BEL2	Bielorrusia	KJ174161.1
CHN1	China	KT329428.1
CHN2	China	KU243336.1
CHN3	China	MF444154.1
CHN4	China	MF444153.1
CHN5	China	MF444152.1
CHN6	China	MF362629.1
CHN7	China	MF362627.1
CHN8	China	MF362626.1
CHN9	China	MF362625.1
CHN10	China	MF285607.1
CHN11	China	GU269892.1
CHN12	China	GU183265.1
CHN13	China	GU183264.1
CHN14	China	KY680280.1
CND1	Canadá	KT878963.1
CND2	Canadá	KT878961.1
CND3	Canadá	KT878960.1
CND4	Canadá	KT878959.1
CND5	Canadá	KT878958.1
DEN1	Dinamarca	KU856580.1
DEN2	Dinamarca	KU856578.1
DEN3	Dinamarca	KU856577.1
DEN4	Dinamarca	KU856576.1
DEN5	Dinamarca	KU856573.1
DEN6	Dinamarca	KU856572.1
DEN7	Dinamarca	KU856568.1
DEN8	Dinamarca	KU856567.1
DEN9	Dinamarca	KU856566.1
DEN10	Dinamarca	KU856564.1
DEN11	Dinamarca	KU513987.1
FIN1	Finlandia	GQ336866.1
FIN2	Finlandia	MG821258.1
FIN3	Finlandia	MG821257.1
FIN4	Finlandia	MG821256.1
FIN5	Finlandia	MG821255.1
FIN6	Finlandia	MG821254.1 2
FIN7	Finlandia	MG821253.1
FIN8	Finlandia	MG821252.1
FIN9	Finlandia	MG821267.1
FIN10	Finlandia	MG821245.1
FIN11	Finlandia	MG821244.1
FIN12	Finlandia	MG821243.1
FIN13	Finlandia	MG821242.1
FIN14	Finlandia	MG821241.1
FIN15	Finlandia	MG821240.1
FIN16	Finlandia	MG821239.1

Código secuencia	Procedencia	Nº acceso GenBank
FIN17	Finlandia	MG821266.1
FIN18	Finlandia	MG821238.1
FIN19	Finlandia	MG821237.1
FIN20	Finlandia	MG821236.1
FIN21	Finlandia	MG821234.1
FIN22	Finlandia	MG821265.1
FIN23	Finlandia	MG821264.1
FIN24	Finlandia	MG821263.1
FIN25	Finlandia	MG821262.1
FIN26	Finlandia	MG821261.1
FIN27	Finlandia	MG821259.1
POL1	Polonia	KT203365.1
POL2	Polonia	KT203355.1
POL3	Polonia	KT203357.1
POL4	Polonia	KT203356.1
RUS1	Rusia	KJ174164.1
RUS2	Rusia	KJ174162.1
RUS3	Rusia	KJ174160.1
RUS4	Rusia	KJ174159.1
RUS5	Rusia	KJ174158.1
RUS6	Rusia	DQ371395.1
SPN1	España	AF205382.1
USA1	Estados Unidos	AF124791.1
USA2	Estados Unidos	KU513988.1



